

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de indometacina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estefanía Tascón Otero

Directoras

Marina de la Torre Iglesias
Covadonga Álvarez Álvarez

Madrid

© Estefanía Tascón Otero, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**Departamento de Farmacia Galénica y
Tecnología Alimentaria**



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de
indometacina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estefanía Tascón Otero

Directores

Paloma Marina de la Torre Iglesias

Covadonga Álvarez Álvarez

Madrid 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Estefanía Tascón Otero,
estudiante en el Programa de Doctorado en Farmacia,
de la Facultad de Farmacia ✓ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de indometacina

y dirigida por: Paloma Marina de la Torre Iglesias y Covadonga Álvarez Álvarez

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 18 ✓ de octubre ✓ de 20 19 ✓

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a la Doctora Emilia Barcia Hernández, como Directora del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria.

A mis directoras de tesis, las doctoras Paloma Marina de la Torre Iglesias y Covadonga Álvarez Álvarez, gracias por guiarme y acompañarme en la consecución de este proyecto que por fin se hace realidad.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento al Doctor Santiago Torrado por su ayuda y colaboración.

Hago extensivos estos agradecimientos a todos los profesores del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria.

También agradecer a mis compañeros del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, el apoyo y ayuda que me han brindado durante estos años.

Gracias enorme y especialmente, a Marcos y a mis padres por la confianza depositada en mí y por ser, siempre y aún más en los peores instantes, el mayor de mis soportes.

Incontables gracias a todos.

A Marcos y a mis padres.

Índice

Agradecimientos	4
A Marcos y a mis padres.	6
Índice	8
Índice de figuras	11
Índice de tablas	13
Abreviaturas	1
Resumen.....	5
Summary	11
1. Introducción general	17
1.1. Indometacina	17
1.1.1. Propiedades físico-químicas.....	17
1.1.2. Indicaciones terapéuticas.....	18
1.1.3. Propiedades farmacodinámicas	19
1.1.4. Propiedades farmacocinéticas	19
1.1.5. Interacciones medicamentosas.....	20
1.1.6. Reacciones adversas.....	22
1.1.7. Contraindicaciones	23
1.1.8. Posología	23
1.1.9. Formas farmacéuticas y presentaciones.....	24
1.2. Variables que afectan a la solubilidad de de sólidos en líquidos	25
1.3. Dispersiones sólidas (DS).....	29
1.3.1. Aspectos generales.....	29
1.3.2. Definición de dispersión sólida	30
1.3.3. Tipos de dispersiones sólidas	30
1.3.4. Métodos de preparación de dispersiones sólidas.....	33
1.3.5. Mecanismos por los que las dispersiones sólidas producen incremento en la velocidad de disolución del fármaco.....	39
1.3.6. Ventajas e inconvenientes de las dispersiones sólidas	41
1.4. Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC)	42
1.4.1. Características generales.....	42

1.4.2. Aplicaciones en tecnología farmacéutica.....	43
1.4.3. Propiedades.....	45
1.4.4. Método de Fabricación	45
1.4.5. Seguridad.....	46
1.5. Laurilsulfato sódico (LSS).....	46
1.5.1. Características generales.....	46
1.5.2. Aplicaciones en tecnología farmacéutica.....	47
1.5.3. Estabilidad y condiciones de almacenamiento.	47
1.5.4. Método de Fabricación	47
1.5.6. Propiedades.....	48
1.5.7. Seguridad.....	48
1.6. Bibliografía	50
2. Objetivo y planteamiento	63
3. Materiales y métodos	67
3.1. MÉTODOS CUANTITATIVOS.....	67
3.1.1. Introducción	67
3.1.2. Materiales y métodos	67
3.1.3. Resultados y discusión	74
3.2. MÉTODOS CUALITATIVOS	90
3.2.1. Ángulo de contacto	90
3.2.2. Estudios de velocidad de disolución de las diferentes formulaciones de IND.....	94
3.2.3. SEM.....	101
3.2.4. Difracción de Rayos X.	102
3.2.5. DSC	103
3.2.6. Estudio farmacocinético tras administración oral de las formulaciones seleccionadas	105
3.2.7. Estudios <i>in vivo</i> de biodisponibilidad tópica	111
3.3. Bibliografía	115
4. Dispersiones sólidas de IND formadas en medio tamponado de fosfato.....	119
4.1. Introducción	119
4.2. Materiales y Métodos	120
4.2.1. Materiales	120
4.2.2. Métodos	121
4.3. Resultados y discusión	125
4.3.1. Ángulo de contacto	125
4.3.2. Ensayos de velocidad de disolución	127

4.3.3. SEM.....	133
4.3.4. XRPD	135
4.3.5. DSC	138
4.4. Bibliografía	141
5. Dispersiones sólidas de IND elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.....	147
5.1. Introducción	147
5.2. Materiales y Métodos	147
5.2.1. Materiales	147
5.2.2. Métodos	149
5.3. Resultados y discusión	151
5.3.1. Ángulo de contacto	151
5.3.2. Ensayos de velocidad de disolución	153
5.3.3. SEM.....	162
5.3.4. XRPD	166
5.3.5.DSC	168
5.3.6. Estudio farmacocinético de las formulaciones seleccionadas tras la administración oral	171
5.4. Bibliografía	175
6. Dispersiones sólidas de IND preparadas en agua alcalinizada con NaOH para administración tópica.....	181
6.1. Introducción	181
6.2. Materiales y métodos	187
6.2.1. Materiales	187
6.2.2. Métodos	188
6.3. Resultados y discusión	191
6.3.1. Estudios de velocidad de disolución de geles tópicos de IND.....	191
6.3.2. Estudios <i>in vivo</i> de biodisponibilidad tópica	193
6.4. Bibliografía	195
7.- Discusión final	201
8.- Conclusiones	211
9.- Bibliografía	215

Índice de figuras

Figura 1.1: Molécula de IND. (Sweetman, 2011).	17
Figura 1.2: Calorimetría diferencial de barrido, IND.	18
Figura 1.3 Métodos de obtención de dispersiones sólidas.	33
Figura 1.4: Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC), donde $R = H$ ó $[CH_2CH(CH_3)O]_mH$. (Rowe, et. al, 2006).	43
Figura 1.5: Microfotografía de L-HPC ampliada 500×.	43
Figura 1.6: Fórmula estructural del laurilsulfato sódico. (Rowe, et al, 2006).	46
Figura 3.1: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20 (0,6 µg/ml) y DS-0:0,12:20 (placebo) a pH 1,2.	74
Figura 3.2: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20 (10 µg/ml) y DS-0:0,12:20 (placebo) a pH 4,5.	75
Figura 3.3: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20 (10 µg/ml) y DS-0:0,12:20 (placebo) a pH 6,8.	75
Figura 3.4: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20-NaOH (0,6 µg/ml) y DS-0:0,12:20-NaOH (placebo) a pH 1,2.	75
Figura 3.5: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20-NaOH (10 µg/ml) y DS-0:0,12:20-NaOH (placebo) a pH 4,5.	75
Figura 3.6: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20-NaOH (10 µg/ml) y DS-0:0,12:20-NaOH (placebo) a pH 6,8.	76
Figura 3.7: Recta de calibrado de IND en pH 1,2.	76
Figura 3.8: Recta de calibrado de IND en pH 4,5.	77
Figura 3.9: Recta de calibrado de IND en pH 6,8.	79
Figura 3.10: Espectro de barrido gel de DS-1:0,12:5-NaOH (5 µg/ml); gel de DS-0:0,12:5-NaOH () y gel de DS-0:0,12:0-NaOH.	85
Figura 3.11: Recta de calibrado de IND en pH 4,5 espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.	86
Figura 3.12: Ángulo de contacto y tensiones interfaciales. (Montes, 2009).	91
Figura 3.13: Configuración experimental para la medición del ángulo de contacto. Cámara de 1 CCD, 2 fuentes de luz, 3 cámara de medición, 4 ordenador.	92
Figura 3.14: Técnica de análisis de forma de caída axisimétrica (ADSA-P) utilizada para el análisis de imágenes.	92
Figura 3.15: Dimensiones de la célula de extracción. (AEMPS, 2015).	99
Figura 3.16: Célula de extracción.	99
Figura 3.17: Esquema de un microscopio electrónico de barrido. (EcuRed, 2018).	101
Figura 3.18: Difracción de rayos X. (Universidad de Málaga, 2006).	103
Figura 3.19: Calorímetro diferencial de barrido. (Mettler Toledo, 2018).	104
Figura 3.20: Cromatograma de un patrón de IND de 75 µg/ml.	108
Figura 3.21: Cromatograma de la fase móvil.	108
Figura 3.22: Recta de calibrado de las muestras patrón.	109
Figura 4.1: Proceso de elaboración de las dispersiones sólidas elaboradas en medio tamponado de fosfato.	124
Figura 4.2: Ángulo de contacto del agua sobre las diferentes formulaciones de IND elaboradas en medio tamponado de fosfato.	126
Figura 4.3: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 1,2.	128

Figura 4.4: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 6,8.	130
Figura 4.5: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 4,5.	133
Figura 4.6: Microfotografías de las distintas formulaciones de IND elaboradas con solución tamponada de fosfato, a 500x.	134
Figura 4.7: difractogramas de las diferentes formulaciones de IND.	137
Figura 4.8: difractogramas de los diferentes excipientes de las formulaciones de IND: ácido bórico (a); SDS (b); L-HPC (c).	138
Figura 4.9: espectros calorimétricos de las diferentes formulaciones de IND.	140
Figura 4.10: espectros calorimétricos de los diferentes excipientes de las formulaciones de IND.	141
Figura 5.1: Proceso de elaboración de las formulaciones preparadas en medio alcalinizado con hidróxido sódico.	150
Figura 5.2: Ángulo de contacto del agua sobre las diferentes formulaciones de IND.	152
Figura 5.3: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 1,2.	154
Figura 5.4: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 6,8.	155
Figura 5.5: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 4,5.	157
Figura 5.6: Perfiles de disolución de la MF-1:0,12:20 y la MF-1:0,12:20-NaOH en comparación con la IND a 37°C a pH 4,5.	159
Figura 5.7: Perfiles de disolución de la DS-1:0,12:0 y la DS-1:0,12:0-NaOH en comparación con la IND a 37°C a pH 4,5.	160
Figura 5.8: Perfiles de disolución de la DS-1:0,12:5 y la DS-1:0,12:5-NaOH en comparación con la IND a 37°C a pH 4,5.	161
Figura 5.9: Perfiles de disolución de la DS-1:0,12:20 y la DS-1:0,12:20-NaOH en comparación con la IND a 37°C a pH 4,5.	162
Figura 5.10: Microfotografías de las distintas formulaciones de IND elaboradas con NaOH, a 500x.	164
Figura 5.11: Microfotografías de las formulaciones DS-1:0,12:5 (a); DS-1:0,12:20 (b); DS-1:0,12:5-NaOH (c) y DS-1:0,12:20-NaOH (d), a 500x.	165
Figura 5.12: Difractogramas de las diferentes formulaciones de IND.	167
Figura 5.13: Espectros calorimétricos de las diferentes formulaciones de IND.	168
Figura 5.14: Espectros calorimétricos de IND (a) y DS-1:0,12:0-NaOH (b).	169
Figura 5.15: Representaciones gráficas de los valores medios y desviaciones estándar de las concentraciones plasmáticas de IND en las formulaciones de IND materia prima y DS-1:0,12:5-NaOH tras la administración oral de una dosis única de 5 mg/kg de principio activo.	171
IND; DS-1:0,12:5-NaOH.	171
Figura 6.1: Capas de la piel.	181
Figura 6.2: Capas de la epidermis.	183
Figura 6.3: perfiles de disolución de un gel de IND materia primay un gel de DS-1:0,12:5-NaOH.	192
Figura 6.4: Absorción media de los diferentes geles de IND.	194

Índice de tablas

Tabla 3.1: Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ a pH 1,2	77
Tabla 3.2: Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ a pH 4,5	78
Tabla 3.3: Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ a pH 6,8	80
Tabla 3.4: Exactitud del método analítico a pH 1,2; 4,5 y 6,8.	81
Tabla 3.5: Precisión del método mediante estudios de repetibilidad a pH 1,2; 4,5 y 6,8.	82
Tabla 3.6: Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia a pH 1,2; 4,5 y 6,8.	82
Tabla 3.7: Absorbancias de 10 blancos.	83
Tabla 3.8: Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ a pH 4,5 espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.	86
Tabla 3.9: exactitud del método analítico a pH 4,5 espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.	87
Tabla 3.10: Precisión del método mediante estudios de repetibilidad a pH 4,5 en el espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.	88
Tabla 3.11: Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia a pH 4,5 espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.	88
Tabla 3.12: absorbancias de 10 blancos.	89
Tabla 4.1: Coeficientes de solubilidad de la IND en diferentes tampones a 37° C y su desviación estándar (σ).	122
Tabla 5.1: Parámetros farmacocinéticos de IND en diferentes formulaciones tras la administración oral de una única dosis de fármaco (5 mg/kg).	172
Tabla 5.2: Los valores de probabilidad (P) del análisis ANOVA con un nivel de confianza de 95% entre cada una de las formulaciones estudiadas con los valores de C_{max} y $AUC_{0-\infty}$	173
Tabla 6.1: Resultados de cuantificación de IND.	189

Abreviaturas

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo.

ANOVA: Análisis de la varianza.

ASES: Sistema de extracción de aerosol (Aerosol Solvent Extraction System).

AUC: Área bajo la curva (Area Under the curve).

COX: Ciclooxygenasa.

DS: Dispersión sólida.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido (differential scanning calorimetry).

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority).

FDA: Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration).

GAS: Antisolvente gaseoso (Gaseous anti solvent).

HPG: hidroxipropil goma guar.

IARC: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (International agency for research on cáncer).

IND: Indometacina.

L-HPC: Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución.

LSS: Laurilsulfato sódico.

MF: Mezcla física.

MSC: Cáncer de piel tipo melanoma (melanoma skin cancer).

NMSC: Cáncer de piel no melanoma (non melanoma skin cancer).

PCA: Partículas por antisolvente comprimido (Particles by Compressed Antisolvent).

PGE2: Prostaglandina E2.

PVP: Polivinilpirrolidona.

PVP-VA: Polivinilpirrolidona-vinilacetato.

RFE: Real Farmacopea Española.

SAS: Antidisolvente súpercrítico (Supercritical Antisolvent).

SC-CO₂: Dióxido de carbono súper crítico.

SCF: Fluidos súper críticos (super critical fluids).

SEDS: Solución de dispersión mejorada por fluidos supercríticos (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids).

SEM: Microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy).

XRPD: Difracción de rayos X (X-ray powder diffraction).

RESUMEN

Resumen

Título

Desarrollo galénico de nuevas formulaciones de indometacina.

Introducción

La indometacina (IND) es un agente antiinflamatorio no esteroideo con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Se cree que su efecto farmacológico está mediado a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), que es responsable de catalizar el paso limitante de la velocidad en la síntesis de prostaglandinas. Sin embargo, la IND es relativamente versátil, y estudios posteriores han señalado su uso potencial en la terapia de prevención del cáncer. Algunos estudios han observado actividad de la IND en cánceres de piel de melanoma (MSC) y no melanoma (NMSC) en estudios con animales e *in vitro*.

Sekiguchi y Obi definieron en 1961, dispersión sólida (DS) como: “la dispersión de uno o más principios activos en un vehículo inerte al estado sólido”.

Varios autores han utilizado hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC) y laurilsulfato sódico (LSS) en la obtención de DS de fármacos poco solubles.

L-HPC, como una matriz inerte, tiene propiedades como disgregante y también mejora la humectabilidad de las DS, las cuales pueden influir en el comportamiento de disolución del fármaco

El LSS es un surfactante aniónico que mejora la humectación del fármaco.

Objetivos

El objetivo de esta tesis es evaluar la capacidad de la L-HPC para alterar la cristalinidad de la IND y aumentar su velocidad de disolución, mediante la preparación de DS por el método de liofilización, con el propósito de incrementar la biodisponibilidad oral y tópica de la IND y en consecuencia los efectos terapéuticos a dosis inferiores a las usadas actualmente.

Con el fin de lograr este objetivo, se llevaron a cabo diferentes etapas:

- Estudio bibliográfico de: IND, L-HPC, solubilidad de sólidos en líquidos, y de DS.
- Métodos analíticos cuantitativos: puesta a punto y validación.
- Estudios de caracterización *in vitro* y evaluación *in vivo* de las diferentes DS de IND.

Resultados y conclusiones

Todas las DS de IND: LSS: L-HPC mejoran la velocidad de disolución de IND. Los resultados de ángulo de contacto, SEM, XRPD y DSC sugieren que el aumento en la tasa de disolución de IND conseguida con las diferentes DS se debe a una reducción en la cristalinidad del fármaco relacionada con el proceso de liofilización y la cantidad de L-HPC añadida a las formulaciones.

La incorporación de L-HPC alteró la morfología de la superficie de las formulaciones y también incrementó su efecto humectante. La formación de una matriz de L-HPC menos porosa se pudo observar por SEM, a medida que aumentaba la proporción de este polímero.

Este aumento en la cantidad de IND disuelta en todos los pH estudiados es significativamente mayor ($P < 0,05$) con las formulaciones elaboradas en agua alcalinizada con NaOH que con las elaboradas en medio tamponado de fosfato. Estas mejoras significativas en los perfiles de disolución se pueden explicar mediante los resultados de SEM, que muestran un aumento en el tamaño de los poros en las DS de IND elaboradas en agua alcalinizada con NaOH respecto a las formulaciones elaboradas en medio tamponado de fosfato.

Los estudios farmacocinéticos llevados a cabo en ratas, demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre las AUC totales de la DS-1:0,12:5-NaOH y de la IND materia prima ($P < 0,05$). Además el valor de P obtenido en el análisis ANOVA sobre C_{max} entre ambas formulaciones es menor de 0,05, observándose también diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados farmacocinéticos obtenidos pueden verse influidos por los excipientes utilizados y el proceso de preparación de las formulaciones. El

proceso de liofilización y la L-HPC utilizada como excipiente, aumentaron la solubilidad de IND, y también de esta forma mejoraron los valores farmacocinéticos y biofarmacéuticos de la DS.

Con respecto a los estudios de formulaciones transdérmicas, los resultados de velocidad de disolución y de biodisponibilidad tópica de IND *in vivo* nos permiten concluir que el gel de DS-1:0,12:5-NaOH, ha demostrado ser un buen recurso para mejorar la velocidad de disolución y la absorción transdérmica del fármaco.

La incorporación en las formulaciones de un promotor de absorción como es el Transcutol® no demostró una mejora significativa ($P>0,05$) para mejorar la absorción de geles IND a través de la piel.

En conclusión, se considera que los geles de hidroxipropil goma guar (HPG) desarrollados utilizando DS de IND son buenos candidatos para ser utilizados en el diseño de sistemas de administración transdérmica de IND.

SUMMARY

Summary

Title

Pharmaceutical development of new indomethacin formulations.

Introduction

Indomethacin (IND) is a non-steroidal anti-inflammatory agent with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity. It is believed that its pharmacological effect is mediated through the inhibition of the enzyme cyclooxygenase (COX), which is responsible for catalyzing the rate-limiting step in prostaglandin synthesis. However, IND is relatively versatile, and further studies have pointed to a potential use in cancer prevention therapy. Some studies have reported activity on melanoma (MSC) and non-melanoma (NMSC) skin cancers in animal and *in vitro* studies.

Sekiguchi and Obi in 1961 defined solid dispersion (DS) as: "the dispersion of one or more active ingredients in an inert carrier or matrix in the solid state"..

Several authors have used low-substituted hydroxypropylcellulose (L-HPC) and sodium lauryl sulfate (LSS) as carriers to obtain DS of poorly soluble drugs.

L-HPC, as an inert carrier, has properties as a disintegrant and also improves the wettability of DS, which can influence the dissolution behavior of the drug.

Sodium lauryl sulfate is an anionic surfactant that improves drug wetting.

Objectives

The main purpose of this doctoral thesis was to evaluate the feasibility of L-HPC in modifying the crystalline characteristics of IND and enhancing its dissolution rate by preparing DS using a freeze-drying method, with the aim of increasing oral and topical bioavailability of IND and consequently its therapeutic effects at lower doses than those currently used.

In order to achieve these purposes, different phases were carried out:

- A bibliographic study of: IND, L-HPC, solubility of solids in liquids, and DS.
- Setting of quantitative analytical methods: validation.
- *In vitro* characterization studies and *in vivo* evaluation of the different IND-DS

Results and conclusions

All DS (IND: LSS: L-HPC) improved the dissolution rate of IND. The results of contact angle, SEM, XRPD and DSC suggested that the improvement in the dissolution rate of IND achieved with the different DS is due to a decrease in the crystallinity of the drug related to the lyophilization process and the amount of L -HPC added to the formulations.

The addition of L-HPC modified the surface morphology of the formulations and also increased their wettability effect. The apparition of a lower porosity in L-HPC matrix could be observed by SEM, when the proportion of this polymer was increased.

This improvement in the amount of IND dissolved is significantly higher ($P < 0.05$) for the formulations prepared with alkalized water (NaOH) than in those prepared in a phosphate buffer medium. These significant improvements in the dissolution profiles can be explained by the SEM results, which showed an increase in the pore size in the IND-DS prepared in alkalized water (NaOH) in comparison to the formulations prepared in a phosphate buffer medium.

The pharmacokinetic studies carried out in rats showed statistical significant differences between the total AUC of the DS-1: 0.12: 5-NaOH and the IND raw material ($P < 0.05$). In addition, the P value obtained in the ANOVA analysis on C_{max} for both formulations is less than 0.05, showing statistical significant differences.

The dissolution rate and bioavailability results of IND allowed us to conclude that the DS-1: 0.12: 5-NaOH gel has shown to be a good candidate to improve the dissolution rates and the IND transdermal absorption.

The addition of an absorption promoter to the formulations, such as Transcutol® did not show a significant increase ($P > 0.05$) in the absorption of IND gels through the skin.

In conclusion, hydroxypropyl guar gum gels developed using IND-DS are considered to be suitable candidates for the design of IND-loaded transdermal delivery systems

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción general

1.1. Indometacina

La indometacina (IND) es un fármaco no esteroide con propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas. No es un analgésico simple y, debido a sus múltiples e importantes efectos adversos, no debe utilizarse en el tratamiento de patologías menores (Gennaro, 2003).

1.1.1. Propiedades físico-químicas

La IND es un AINE (antiinflamatorio no esteroideo) derivado del ácido indolacético, (2-[1-(4-clorobenzoyl)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il] ácido acético). (Figura 1.1) (Real Farmacopea Española, RFE, 2015).

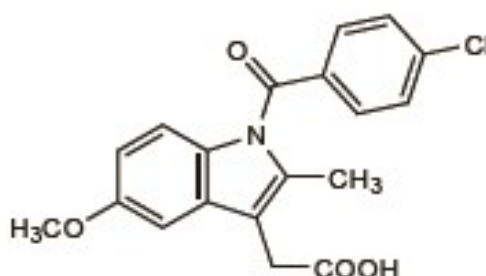


Figura 1.1: Molécula de IND. (Sweetman, 2011).

La IND contiene no menos del 98,5 por ciento y no más del equivalente al 100,5 por ciento de ácido [1-(4-clorobenzoyl)-2-metil-5-metoxiindol-3-il]acético, calculado con respecto a la sustancia desecada (RFE, 2015).

Es un polvo cristalino, blanco o amarillo, prácticamente insoluble en agua (0,937 mg/l), bastante soluble en etanol al 96 por ciento, con punto de fusión de 158 °C a 162 °C. (RFE, 2015). En esta tesis se ha utilizado el polimorfo I o de referencia, obteniéndose un pico endotérmico a 160,99°C (-116.05 J/g). (Figura 1.2.).

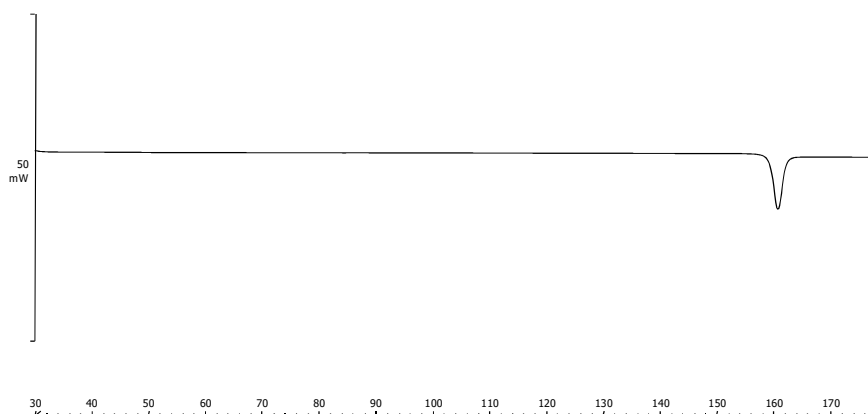


Figura 1.2: Calorimetría diferencial de barrido, IND.

Su espectro ultravioleta-visible muestra dos picos de máxima absorbancia a 230 y 279 nm en solución tampón fosfato pH 7,2 y un único máximo en ácido metanólico a 318 nm. (RFE,2015).

Tiene un pKa de 4,5, su contenido en cenizas es menor del 0,1 %. La pérdida en peso por desecación de 1 g a 105°C es como máximo del 0,5% de su peso (RFE, 2015).

1.1.2. Indicaciones terapéuticas

Según su ficha técnica la IND se encuentra indicada en el tratamiento de los estadios activos en enfermedades reumáticas crónicas inflamatorias (artritis reumatoide, espondiloartritis anquilosante y osteoartritis), como tratamiento sintomático en el ataque agudo de gota y en procesos musculoesqueléticos agudos y en el tratamiento de inflamaciones, dolor y tumefacciones postraumáticas (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS, 2017).

Se ha descrito que la IND mejora la hipopotasemia y otras características clínicas presente en el Síndrome de Bartter, probablemente mediante bloqueo del eje cinina-prostaglandina al inhibir la ciclooxigenasa (COX) (Sweetman, 2011).

Asimismo la IND disminuye el volumen de orina en todos los tipos de diabetes insípida nefrogénica (Sweetman, 2011).

Algunos estudios muestran cierta actividad sobre el cáncer de piel tipo melanoma (MSC) y el cáncer de piel no melanoma (NMSC) en estudios con animales e *in vitro* (Lichtenberger, et al., 2018). En seres humanos, algunos estudios experimentales han demostrado que los antiinflamatorios no esteroideos tópicos u orales pueden llevar a la regresión de las neoplasias de la piel (Grau, et al., 2006). En un estudio reciente se observó que la prostaglandina PGE2 es secretada por las células tumorales resistentes y que la inhibición de la producción de prostaglandina E2 (PGE2) por IND, eliminó el factor de supresión de macrófagos del sobrenadante y sensibilizó a las células tumorales resistentes a la citotoxicidad de macrófagos (Somasundaram y Herlyn, 2014). Este estudio enfatiza el importante papel de la PGE2 secretada por el tumor en escapar de la vigilancia de macrófagos y justifica el uso de inhibidores de la COX como adyuvantes para mejorar la inmunoterapia del tumor.

Por otra parte, la IND por vía tópica está indicada en cuadros dolorosos e inflamatorios del aparato locomotor. Afecciones reumáticas de parte blandas: tendinitis, tendovaginitis, rigidez dolorosa del hombro, miositis. Afecciones reumáticas de la articulación: artrosis, capsulitis y pericapsulitis. Lesiones traumáticas y deportivas: distensiones, contusiones, esguinces. Algias musculares en general: lumbago, tortícolis, etc. (AEMPS, 2016).

1.1.3. Propiedades farmacodinámicas

La IND es un fármaco antiinflamatorio, analgésico y antipirético. La IND ejerce su mecanismo de acción mediante la inhibición de la ciclooxigenasa formadora de prostaglandinas (Vane, 1971) (Smith y Willis, 1971). Así mismo la IND produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Bjarnason, et al., 2018).

1.1.4. Propiedades farmacocinéticas

La IND se absorbe completa y fácilmente en el tracto gastrointestinal por vía oral. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan aproximadamente a las 2 horas después de la administración de una dosis. Su absorción se

puede ralentizar con la administración de alimentos o por antiácidos que contengan aluminio o magnesio. En neonatos prematuros, la absorción de La IND por vía oral es pobre e incompleta. Se ha descrito que la biodisponibilidad de la IND por vía rectal en adultos es comparable o ligeramente menor que la biodisponibilidad cuando se administra por vía oral (Sweetman, 2011; AEMPS, 2017).

La IND está unida en un 99% a las proteínas plasmáticas. Se distribuye en el líquido sinovial, el SNC y la placenta. Se han observado bajas concentraciones en la leche materna (Sweetman, 2011; AEMPS, 2017).

Su semivida terminal de eliminación es de 2,6 a 11,2 horas en adultos y de entre 12 y 28 horas en neonatos. La IND se metaboliza en el hígado a su conjugado glucurónico y a desmetilindometacina, desbenzoilindoemtacina, desmetil-desbenzoilindoemtacina, y a sus glucurónidos. Alguna IND sufre N-deacilación (Sweetman, 2011; AEMPS, 2017).

La IND y sus conjugados experimentan circulación enterohepática. La excreción de la IND y sus metabolitos se produce principalmente por orina y en menor medida por heces (Sweetman, 2011).

1.1.5. Interacciones medicamentosas

La administración concomitante de IND y antiagregantes plaquetarios, corticoides, ácido acetilsalicílico, diflunisal o AINEs puede aumentar el riesgo de sangrado gastrointestinal (AEMPS, 2017). Se han descrito casos de hemorragia gastrointestinal con desenlace fatal al administrar conjuntamente diflunisal e IND (Sweetman, 2011).

Los AINEs pueden aumentar los efectos de los anticoagulantes de tipo dicumarínico (AEMPS, 2017).

El metotrexato se elimina principalmente por secreción tubular renal a través de transportadores de aniones orgánicos. Se ha observado una toxicidad grave por metotrexato, debido a un aumento en las concentraciones séricas de este fármaco después de la administración conjunta con fármacos antiinflamatorios no esteroideos como la IND (Uwai, et al., 2000).

Los antibióticos aminoglucósidos administrados conjuntamente con IND pueden ver reducida su eliminación y con ello el aumento del riesgo de nefro y ototoxicidad e hiponatremia (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, CGCOF, 2017).

La IND antagoniza los efectos natriurético y antihipertensivo de los diuréticos del asa, de los diuréticos ahorradores de potasio y de las tiacidas. Esta interacción se debe a que la IND inhibe la síntesis de prostaglandinas A y E a nivel renal y extra renal, por lo que produce una disminución de la diuresis como consecuencia de una reducción en el flujo sanguíneo renal. Además, se han descrito casos de aumento de riesgo de lesión renal al combinar IND con diuréticos e inhibidores del eje renina-angiotensina-aldosterona (Dreischulte, et al., 2015).

También reduce el efecto antiinflamatorio de β -bloqueantes como el atenolol, debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por parte de la IND. Los salicilatos y antiácidos disminuyen efecto antiinflamatorio de la IND, por adsorción de los antiácidos a la IND disminuyendo la cantidad absorbida en el intestino delgado (CGCOF, 2017).

La administración concomitante de IND y litio produce elevación de relevancia clínica del litio en plasma y una reducción del aclaramiento renal del litio en pacientes psiquiátricos y en sujetos normales con concentraciones plasmáticas de litio en estado de equilibrio. Este efecto se ha atribuido a la inhibición de la síntesis prostaglandinas (AEMPS, 2017).

La nefrotoxicidad es un efecto adverso bien conocido de la ciclosporina que posiblemente debido a la reducción de la síntesis renal de prostaciclina se agrave con la administración concomitante de ciclosporina e IND (El-Yazbi, et al., 2018).

Si se administra IND a pacientes que están siendo tratados con probenecid, es probable que aumente la concentración plasmática de IND, aumentando el efecto antiinflamatorio pero también su toxicidad (AEMPS, 2017).

Se han detectado aumentos en la concentración sérica de digoxina así como de su semivida cuando se administra de manera concomitante IND y digoxina (AEMPS, 2017).

También se han descrito crisis hipertensivas, probablemente por inhibición de la síntesis de las prostaglandinas por IND, al administrar IND y fenilpropanolamina de manera concomitante (AEMPS, 2017).

1.1.6. Reacciones adversas

Los efectos adversos producidos por la IND son más frecuentes que en otros AINEs (Sweetman, 2011). Un 35-50% de los pacientes que son tratados con IND sufren efectos adversos y alrededor del 20% suspenden el tratamiento (Brunton, 2011).

Los efectos adversos son dosis-dependientes por tanto se determina la dosis efectiva mínima para cada individuo. Las reacciones adversas más comunes se describen a continuación (Sweetman, 2011).

- Trastornos gastrointestinales: perforación gastrointestinal, ulceración y sangrado y raramente se han reportado constricciones intestinales.
La ulceración gástrica es el trastorno gastrointestinal más prevalente, causa 15 muertes por cada 15,000 complicaciones cada año en el mundo. (Shristi, et al., 2012).
El mecanismo de acción por el cual se produce la ulceración no está claro. Hay diferentes opiniones sobre cómo la IND produce daño gástrico: inhibe la liberación de factores protectores como la ciclooxigenasa-1 (COX-1), la prostaglandina E2 (PGE2), el bicarbonato y el moco; aumenta los factores agresivos como el ácido; e incrementando los parámetros oxidantes y disminuyendo los parámetros antioxidantes. (Suleyman, et al., 2010).
- Trastornos del Sistema Nervioso: dolor de cabeza, vértigo, somnolencia, insomnio, síncope, convulsiones, neuropatía periférica, mareos y aturdimiento.
- Trastornos psiquiátricos: depresión, confusión y otros trastornos psicológicos.

- Trastornos oculares: visión borrosa y depósitos corneales.
- Trastornos del oído: tinitus e hipoacusia.
- Trastornos del sistema inmunológico: prurito, urticaria, alopecia y erupciones cutáneas.
- Trastornos hematológicos: leucopenia, púrpura, trombocitopenia, anemia aplásica, anemia hemolítica y agranulocitosis,
- Trastornos hormonales: hiperglucemia e hipoaldosteronismo.
- Trastornos cardíacos: hipertensión.
- Trastornos hepáticos y renales: hepatitis, ictericia, hematuria e insuficiencia renal.
- Otros trastornos: edema, aumento de peso, estomatitis, epistaxis, hiperpotasemia y hemorragia vaginal.

Las reacciones de hipersensibilidad pueden ocurrir en pacientes sensibles a la aspirina. Irritación rectal se ha reportado sangrado ocasionalmente en pacientes que han recibido supositorios de IND.

1.1.7. Contraindicaciones

Según su ficha técnica, la IND se encuentra contraindicada en caso de hipersensibilidad a la IND, en pacientes con antecedentes de asma, urticaria o rinitis tras haber tomado ácido acetilsalicílico u otro AINE, en pacientes con antecedentes de hemorragia gastrointestinal o perforación relacionados con tratamientos anteriores con AINE, en úlcera péptica o hemorragia gastrointestinal activa o recidivante Insuficiencia cardíaca grave, en el tercer trimestre de la gestación y durante la lactancia, en el tratamiento del dolor perioperatorio en el caso de revascularización coronaria con injerto y en niños menores de 14 años (AEMPS, 2017).

1.1.8. Posología

La dosis inicial de IND por vía oral es 25 mg, dos o tres veces al día, y puede aumentarse en 25 ó 50 mg con intervalos semanales, hasta alcanzar la dosis total diaria de 150 a 200 mg. La mayoría de los pacientes responden a los 4-6 días del inicio del tratamiento. Debe administrarse acompañada o después de una comida, con suficiente cantidad de líquido con el objetivo de disminuir los síntomas gastrointestinales (AEMPS, 2017).

La dosis diaria máxima de IND para administración tópica es de 200 mg al día (AEMPS, 2016).

1.1.9. Formas farmacéuticas y presentaciones

La IND en España se encuentra comercializada en forma de cápsulas 25 y 50 mg, en cápsulas de liberación sostenida de 75 mg, en forma de spray con una concentración de 8 mg/ ml, así como en forma de supositorios de 100 y 50mg (AEMPS, 2017).

1.2. Variables que afectan a la solubilidad de de sólidos en líquidos

El estudio de las variables que afectan a la solubilidad de los fármacos es de especial importancia ya que para que ocurra la absorción de los principios activos a través de las membranas biológicas, los solutos deben encontrarse disueltos.

Sólo se estudiarán algunos de los factores que afectan a la solubilidad como son la temperatura, la presencia de aditivos, el pH, hidratos y solvatos, polimorfismo y la cristalinidad. A pesar de que son muchos más los factores que influyen en la solubilidad: la naturaleza del solvente (cosolventes), existen otros factores como son el del ión común, la estructura molecular del soluto y la utilización de sales de medicamentos

Efecto de la temperatura: ecuación de Van't Hoff

La importancia de este factor es fundamental en el caso de preparaciones líquidas, pues la solubilidad de un principio activo y otro componente de la formulación puede disminuir como consecuencia de variaciones de temperatura, formando un sedimento en el fondo del envase, con la consiguiente pérdida de integridad de la forma farmacéutica. (Bustamante y Guzmán, 1997).

Como la actividad de un compuesto en solución diluida se aproxima a su concentración y en este caso es la solubilidad (K_s), podemos usar la ecuación de Van't Hoff, que establece la relación entre una constante de equilibrio (aquí la solubilidad) y la temperatura absoluta,

$$\ln K_s = \frac{\Delta H_s^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_s^\circ}{R}$$

Cuando el calor de solución (ΔH_s°) es negativo, lo cual significa que se libera energía durante la disolución, al aumentar la temperatura disminuye la solubilidad. (Bustamante y Guzmán, 1997).

En este caso la representación de la ecuación de Van't Hoff dará una línea recta de pendiente positiva. En cambio cuando el calor de solución es positivo,

la relación $\ln K_s$ vs. $1/T$ predice una variación lineal de pendiente negativa, y la solubilidad aumenta al aumentar la temperatura. (Bustamante y Guzmán, 1997).

Si las magnitudes termodinámicas (ΔH°_s y ΔS°_s) que acompañan al proceso de disolución se han determinado, la ecuación se aplicará para estimar la solubilidad a otra temperatura. (Bustamante y Guzmán, 1997).

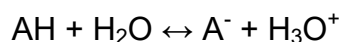
Influencia del pH

La mayoría de los compuestos de interés farmacéutico son electrolitos débiles y en solución acuosa coexisten en equilibrio especies disociadas y no disociadas. (Bustamante y Guzmán, 1997).

El grado de ionización de un electrolito, entendido como el porcentaje de especies ionizadas, influye notablemente en la solubilidad en agua, ya que la parte ionizada es más soluble en este líquido. (Bustamante y Guzmán, 1997).

El pH del medio de disolución condiciona el grado de ionización y por tanto la solubilidad del principio activo. La tendencia a la disociación se mide mediante el logaritmo negativo de las constantes de ionización, pK_a y pK_b . (Bustamante y Guzmán, 1997).

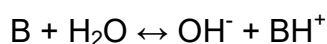
La ionización de un principio activo ácido se puede representar como:



$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

donde K_a es la constante de acidez del ácido.

Para principios activos básicos sería:



$$pH = pK_w - pK_b - \log \frac{[BH^+]}{[B]}$$

donde K_b es la constante de basicidad de la base, K_w es la constante de disociación o producto iónico del agua y $pK_a + pK_b = pK_w = 14$.

Teniendo en cuenta lo anterior, la velocidad de disolución de ácidos orgánicos débiles estará facilitada al pH fisiológico del intestino, donde predomina la forma ionizada y no al pH fisiológico del estómago. Para principio activos bases débiles sucederá lo contrario. (Bustamante y Guzmán, 1997).

Presencia de aditivos

En solución acuosa, un ion crea un campo eléctrico a su alrededor que altera la estructura ordenada del agua. Debido a que esta tiene una estructura dipolar, se establece una interacción electrostática del tipo ion-dipolo. Como resultado, se forman varias capas de moléculas de agua unidas al ion, cuyo comportamiento difiere del resto de moléculas de agua libre. (Bustamante y Guzmán, 1997).

El número medio de moléculas de agua que interaccionan con el ion se conoce como índice de hidratación, y la energía desprendida en el proceso es el calor de hidratación. (Bustamante y Guzmán, 1997).

Cuanto mayor sea la fuerza iónica, menor será el número de moléculas de agua libre disponibles para solvatar a un soluto. Por lo tanto, si se añade una sal a una disolución concentrada de un fármaco no electrólito, se puede producir un efecto salino negativo, es decir, causar precipitación. Si por el contrario, la interacción del fármaco con el ion es superior a la de este con el agua, la solubilidad aumenta y se produce un efecto salino positivo. Esto ocurre cuando el momento dipolar del fármaco es mayor que el del agua o cuando las fuerzas de atracción ion-fármaco superan a las de atracción ion-disolvente. (Bustamante y Guzmán, 1997).

Siguiendo la ecuación de Setschenow la cuantificación del efecto de un aditivo en la solubilidad de otro soluto sigue la siguiente expresión:

$$\log \frac{S_0}{S} = K C_a$$

Donde S es la solubilidad en presencia del aditivo, C_a es la concentración del aditivo, S_0 es la solubilidad en ausencia del aditivo y K es el coeficiente de exaltación. K es positivo cuando el coeficiente de actividad aumenta con el aditivo y es negativo cuando el coeficiente de actividad disminuye con el aditivo. Es decir si K es negativo la solubilidad se ve exaltada. (Bustamante y Guzmán, 1997).

Cristalinidad

Los sólidos cristalinos pueden convertirse en amorfos por diferentes procedimientos como la liofilización, la pulverización mecánica y la desecación en lecho fluido.

La obtención de formas amorfas puede ser ventajosa para los principios activos poco solubles en agua, ya que su solubilidad y biodisponibilidad son superiores a las de las formas cristalinas. El problema práctico con las formas amorfas es su tendencia cristalizar espontáneamente durante su almacenamiento así como la dificultad de predecir el tiempo que requiere la formación del núcleo cristalino y su crecimiento. (Bustamante y Guzmán, 1997).

El grado de cristalización relativo de un compuesto se puede evaluar a partir de su entalpía de disolución (ΔH_s), tomando como referencias las entalpías de disolución de la forma 100% cristalina (ΔH_c) y la forma 100% amorfa (ΔH_a) del mismo compuesto:

$$P_c = 100 \left(\frac{\Delta H_s - \Delta H_a}{\Delta H_c - \Delta H_a} \right)$$

Polimorfismo

Algunos fármacos pueden cristalizar en una o más formas cristalinas, denominadas “formas polimórficas”. De una forma polimórfica a otra, la solubilidad, el punto de fusión, la densidad, la dureza y la forma del cristal

varían. Los polimorfos son idénticos en estado líquido y de vapor; sólo difieren en la estructura del cristal. La forma polimórfica con la menor energía libre será la más estable y poseerá el punto de fusión más alto.

El polimorfismo se puede estudiar por diferentes técnicas, entre ellas está la calorimetría diferencial de barrido (DSC), que permite determinar la temperatura y el punto de fusión de los polimorfos. (Bustamante y Guzmán, 1997).

Solvatos e hidratos

El pseudopolimorfismo consiste en la formación de hidratos, cuando el disolvente es agua o solvatos, cuando los disolventes son otros, del soluto sólido. Este fenómeno se produce ya que el sólido cristalino puede retener moléculas de disolvente por simple absorción, y el disolvente pasa a formar parte del cristal. (Bustamante y Guzmán, 1997).

Las propiedades físicas del sólido se ven afectadas al igual que ocurre con el polimorfismo. Si el punto de fusión y/o la entalpía de fusión del solvato difieren de las del sólido original, la solubilidad se modifica, siendo los solvatos sólidos menos solubles que el sólido original en el disolvente donde forman el solvato. (Bustamante y Guzmán, 1997).

1.3. Dispersiones sólidas (DS)

1.3.1. Aspectos generales

Con el objetivo de mejorar la disolución y la biodisponibilidad de sulfatiazol, Sekiguchi y Obi en 1961 prepararon una mezcla eutéctica de sulfatiazol con urea como matriz hidrosoluble, por el método de fusión (Sekiguchi y Obi, 1961). En las primeras etapas del desarrollo de las DS se usaban principalmente sólidos altamente cristalinos y solubles en agua como urea, manitol, sorbitol, y sucrosa, estas se conocen como las DS de primera generación y el principio activo predominantemente estaba en estado cristalino (Vasconcelos, et al., 2007). Con el objetivo de mejorar la disolución de las DS surgieron las DS de segunda generación, también llamadas DS amorfas. Para su elaboración se

utilizaron matrices amorfas principalmente polímeros (Simonelli, et al., 1969). En la última década, se ha demostrado que el perfil de disolución mejora si la matriz tiene actividad superficial o autoemulsionante, esto dio lugar a las DS de tercera generación. Estas DS están formadas por una matriz surfactante, o una mezcla de polímeros amorfos y tensioactivos como matriz. Estas dispersiones están destinadas a lograr el mayor grado de biodisponibilidad y además estabilizan la DS evitando la recrystalización del fármaco. (Karataş, et al., 2005; van Drooge, et al., 2006; Van den Mooter, et al., 2006).

1.3.2. Definición de dispersión sólida

Una dispersión sólida se define como la dispersión de uno o más principios activos en un vehículo inerte al estado sólido (Sekiguchi y Obi, 1961).

1.3.3. Tipos de dispersiones sólidas

La clasificación de las DS en cuanto a su estructura física y química fue llevada a cabo por Chiou y Riegelman 1971. Los métodos de caracterización de estas formulaciones son la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la difracción de rayos X (XRPD), la microscopía electrónica de barrido (SEM) y los estudios de disolución del fármaco.

Las DS pueden clasificarse en mezclas eutécticas simples, soluciones sólidas, precipitados amorfos en un vehículo cristalino, complejos o compuestos y las formadas por mecanismos misceláneos o de combinación. (Ballesteros y Guzmán, 1997).

Mezclas eutécticas simples.

Una mezcla eutéctica simple consiste en dos compuestos que son completamente miscibles en estado líquido pero que presentan solubilidad muy limitada en estado sólido.

Una mezcla eutéctica de un fármaco poco soluble en agua y un polímero o vehículo altamente soluble en agua puede ser considerado termodinámicamente como una mezcla física íntima de sus dos componentes cristalinos y estos se asume que cristalizan simultáneamente en tamaños de

partículas muy pequeños y por lo tanto aumenta la solubilidad de un fármaco poco soluble en agua.

Soluciones sólidas.

Las soluciones sólidas consisten en un soluto sólido disuelto en un solvente sólido. En solución sólida, el tamaño de partícula se reduce a nivel molecular.

Las soluciones sólidas se pueden clasificar en tres categorías basadas en su miscibilidad (Ballesteros y Guzmán, 1997).

Soluciones sólidas continuas.

En estas soluciones los componentes son solubles en estado sólido en todas las proporciones.

Estas soluciones sólidas también son conocidas como isomorfas, completas o ilimitadas.

Soluciones sólidas discontinuas.

Los componentes son solubles en estado sólido en determinadas proporciones.

En general casi todas las sustancias son solubles al estado sólidos con otras sustancias, siempre que la proporción del principio activo sea lo suficientemente pequeña.

Soluciones sólidas sustitucionales.

En estas soluciones la molécula de soluto sustituye a una molécula de solvente. Para que estas soluciones se den, los tamaños de partícula de ambos componentes deben parecerse. El tamaño de sus diámetros debe diferir menos del 15%.

Precipitados amorfos en un vehículo cristalino.

La velocidad de disolución de los polvos amorfos es mayor, debido a que su energía es menor. Es probable que la técnica más adecuada para su formación sea la de enfriamiento rápido.

Formación de complejos o compuestos.

Aunque los complejos o compuestos no son DS propiamente dichas, estos se forman durante los procesos de elaboración de las mismas.

Ejemplos conocidos son la formación de compuestos insolubles y por lo tanto no activos de polivinilpirrolidona con algunos principios activos como la penicilina, novacaína, hexobarbital y quinina.

Mecanismos misceláneos o de combinación.

Existen DS que se presentan como una mezcla de los cuatro tipos descritos anteriormente.

1.3.4. Métodos de preparación de dispersiones sólidas

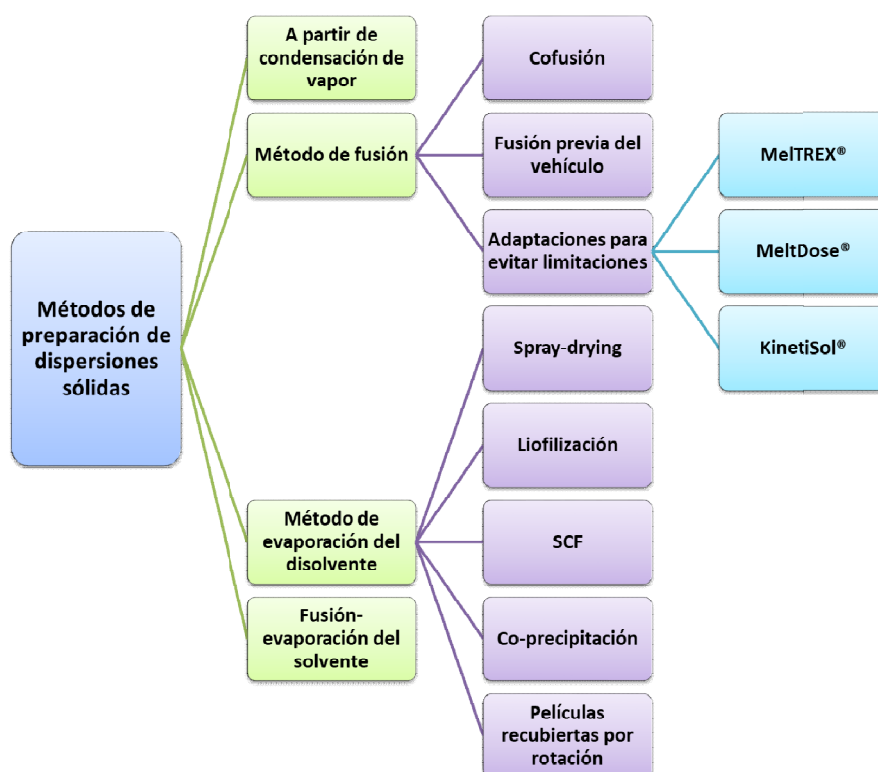


Figura 1.3 Métodos de obtención de dispersiones sólidas.

1.3.4.1. Método de condensación a partir de vapor

Este método consiste en la generación de una corriente de vapor del material y hacerlo incidir sobre un sustrato frío el vapor condensa y se forma una estructura amorfa. La formación del vapor se produce dentro de una cámara de vacío. Este método es adecuado para metales, ya que son estables en estado de vapor. (Zallen, 2008).

1.3.4.2. Método de fusión

Método cofusión: Sekiguchi y Obi (1964) fueron los primeros en utilizar un método de fusión consistente en fundir el fármaco dentro de la matriz seguido de enfriamiento y pulverización del producto obtenido. En el proceso de fusión, la movilidad molecular de la matriz es lo suficientemente alta como para

permitir la incorporación del fármaco. Este método es sólo aceptable a escala de piloto, y no es posible en el caso de principios activos y excipientes termolábiles.

Método de fusión previa del vehículo: consiste en suspender el fármaco en una matriz previamente fundida, en lugar de usar tanto el fármaco como la matriz fundidos (cofusión), reduciendo, por tanto, la temperatura del proceso. (Karata, et al., 2005). Al igual que en el caso anterior el enfriamiento puede ser lento a temperatura ambiente, mediante almacenamiento dentro de un desecador, por solidificación en placas Petri dentro de un desecador, o bien rápida mediante inmersión en un baño de hielo, o por inmersión en nitrógeno líquido. Finalmente, la mezcla sólida es pulverizada y tamizada.

- en baño de hielo, Sekiguchi y Obi (1964) .
- solidificación en placas de Petri a temperatura ambiente dentro de un desecador (Won, et al 2005).
- inmersión en nitrógeno líquido (Yao, et al., 2005).
- almacenamiento en un desecador (Timko y Lordi 1979).

Al igual que en el método de cofusión se presentan como limitaciones el uso de altas temperaturas, que impide su uso en caso de utilizar excipientes o principios activos termolábiles, además puede ocurrir que la miscibilidad entre el principio activo y la matriz no sea completa debido a la alta viscosidad de la matriz polimérica en estado fundido.

2.3.- Modificaciones del método de fusión para evitar las limitaciones, extrusión en caliente: el uso de esta técnica en la preparación de DS fue desarrollado por primera vez en 1971 por El-Egakey et al. Este método consiste en la extrusión, a alta velocidad de rotación, del fármaco y la matriz, previamente mezclados, a temperatura de fusión durante un pequeño periodo de tiempo. El producto resultante se recoge después de enfriar a temperatura ambiente y se muele. Ejemplos de DS preparadas con éxito mediante esta técnica son DS de ritonavir con PVP-VA (Tho, et al., 2010) y ketoconazol con PVP (polivinilpirrolidona) y PVP-VA (polivinilpirrolidona-vinilacetato) (Kanaujia,

et al., 2011) paracetamol y EUDRAGIT (Qi, et al., 2008), ácido oleanólico y PVP-VA (Gaoa, et al., 2017).

A continuación se presentan las tecnologías desarrolladas por varias compañías basadas en la extrusión por fusión en caliente en el campo de la formulación farmacéutica.

Meltrex™: esta tecnología utiliza una extrusora de doble tornillo especial y dos tolvas independientes en las que la temperatura puede variar en un amplio rango. Este proceso permite un tiempo de permanencia reducido del fármaco en el extrusor, permitiendo un flujo de masa continuo y evitando el estrés térmico del fármaco y los excipientes. Además esta tecnología permite una mayor estabilidad que los métodos convencionales (Rosenberg y Breitenbach, 1998).

MeltDose®

Holm et al. (2007) inventaron el proceso de aglomeración controlada, donde se incorpora la sustancia farmacológica poco soluble en agua en un vehículo fundible. Después se rocía sobre partículas portadoras inertes utilizando equipos de lecho fluido. Posteriormente se produce la solidificación. De esta manera la masa fundida se solidifica sobre las partículas portadoras en la forma de DS, en donde el fármaco se encontrará de forma amorfa en solución sólida o como nanocristales.

El producto final puede transformarse en comprimidos o cápsulas. Al igual que el método anterior, permite aumentar la estabilidad y con ello la vida útil del producto.

KinetiSol®

Este método de fabricación de DS consiste en una cámara con un eje central giratorio que contiene una serie de paletas de mezcla, generándose una alta energía de fricción al impactar las partículas, lo que da como resultado incrementos muy rápidos de la temperatura con tiempos de procesamiento totales generalmente inferiores a 20 s. El proceso ha permitido la elaboración de dispersiones sólidas amorfas sin el uso de plastificantes (DiNunzio, et al., 2010), incluidos los polímeros

no termoplásticos y los polímeros térmicamente lábiles (Hughey et al., 2012).

Esta tecnología ofrece varias ventajas como la exposición corta a alta temperatura, lo que permite su uso con fármacos termolábiles.

1.3.4.3.- Método de evaporación del solvente

El método de evaporación del solvente consiste en la solubilización del fármaco y el vehículo en un solvente volátil que luego se evapora, la concentración suele ser de entre el 5 y el 30% p/ p. Un inconveniente de este método es que la eliminación del solvente a temperatura elevada bajo vacío puede causar la separación de fases debido a una mayor movilidad molecular del principio activo y la matriz. Por el contrario, esta técnica permite el uso de fármacos y matrices termolábiles ya que la evaporación del disolvente se produce a baja temperatura. El método de evaporación del disolvente más utilizado en las etapas iniciales de formulación de un principio activo nuevo es el de evaporación por medio de un rotavapor, (Hu, et al., 2018) porque requiere una cantidad mínima de principio activo, es rápido y relativamente barato, existen distintos métodos de evaporación de los disolventes, los más usados son el secado por pulverización (spray-drying), la liofilización y el uso de fluidos supercríticos (SCF).

El secado por pulverización (spray-drying): esta técnica consiste en disolver o suspender el fármaco y la matriz en un disolvente adecuado y después se elimina éste mediante pulverización por corriente de aire caliente (Bakatselou, et al., 1991). Es uno de los métodos de evaporación de disolventes más utilizados en la producción de DS. Ejemplos de preparación de DS por este método son dispersiones sólidas de nilotinib hicrocloruro con Soluplus® (Herbrink, 2018) celecoxib y Soluplus® (Motallae, et al., 2018) piroxicam y D-glucosamina hidrocloruro (Adebisi, et al., 2016).

Liofilización: el fármaco y la matriz se disuelven en un solvente común, se congelan y se subliman para obtener una dispersión molecular liofilizada

(Betageri y Makarla, 1995). Ejemplos de preparación de DS por este método son DS de nevirapina con dextranos de bajo peso molecular (Lokamatha, et al., 2011) o la preparación de DS de efavirenz con polyvinylpyrrolidone K-30 (Fitriani, et al., 2016) entre otras muchas otras DS con resultados satisfactorios. Este ha sido el método elegido para realizar las DS objeto de esta tesis.

Fluidos súper críticos (SCF): esta tecnología empezó a usarse en la industria farmacéutica en los años 80, consiste en la solvatación de un soluto en un fluido súper crítico (sustancias existentes como una sola fase fluida por encima de su temperatura y presión críticas) seguida de una despresurización rápida a través de una boquilla que provoca una sobresaturación y consecuentemente la nucleación de las partículas. Los fluidos supercríticos más utilizados son el dióxido de carbono fluido supercrítico, óxido nitroso, agua, metanol, etanol, etano, propano, n-hexano y amoníaco. El dióxido de carbono (CO₂) es el SCF más utilizado porque es químicamente inerte, no tóxico y no inflamable (Karanth, et al., 2006). El uso de procesos que utilizan SCF reduce el tamaño de partícula, disminuye el contenido de disolvente residual, y evita la degradación del fármaco, además de conseguir altos rendimientos (Majerik, et al., 2007).

Existen diferentes procesos basados en el uso de SCF, se pueden distinguir dos grandes grupos:

- Procesos que utilizan fluidos supercríticos como solvente. Los primeros en utilizar este método fue Krukoni (1984). El fluido se utiliza como disolvente de cristalización, el soluto se disuelve primero en un fluido supercrítico, luego la solución se expande rápidamente por descompresión repentina, normalmente pasando por un orificio a baja presión. Esta tecnología se ha demostrado que es eficiente en la obtención de DS. (Subramaniam, et al., 1997).
- Procesos que utilizan fluidos supercríticos como antidisolvente. El primero en proponer esta alternativa a la anterior técnica fue Gallagher et al. en 1989 para evitar el inconveniente que presentaba ésta dada la escasa solubilidad de la mayoría de los compuestos orgánicos en SC-CO₂ (dióxido de carbono súper crítico). En este caso, el fluido supercrítico (antidisolvente) entra en contacto con el soluto disuelto en

un disolvente orgánico adecuado, debido a la fuerte disminución del poder disolvente de la fase orgánica se forman cristales. Shethia y Squillante (2002) desarrollaron DS de carbamazepina siguiendo esta técnica y observaron ventajas en comparación con los métodos convencionales. Dentro de los procesos que utilizan fluidos supercríticos como antidisolvente se pueden distinguir, el método GAS (Gaseous Anti Solvent), la técnica PCA (Particles by Compressed Antisolvent), la técnica SAS (Supercritical Antisolvent), el método ASES (Aerosol Solvent Extraction System) y el método SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids).

Co-precipitación: esta técnica consiste en agregar un anti-disolvente gota a gota a la solución del fármaco y a la matriz, bajo agitación constante. De esta manera, al adicionar el anti-disolvente el fármaco y la matriz coprecipitan y forman micropartículas que posteriormente se filtran y secan. Esta técnica es una buena opción cuando se trabaja con compuestos que presentan baja solubilidad en solventes volátiles y altos puntos de fusión y propensión a la degradación del principio activo o del polímero a temperaturas elevadas (Dong, et al., 2007; Mann, et al., 2018).

Las películas recubiertas por rotación (spin-coated films): El método de hilado electrostático implica la introducción de un líquido en un campo eléctrico mediante el cual el líquido produce fibras. A medida que el solvente se evapora, se forman las fibras que se recogen posteriormente (Deitzel, et al., 2001; Verreck, et al., 2003).

La principal ventaja de esta técnica es que se puede usar para la elaboración de DS de fármacos sensibles a la humedad. Sin embargo, la dificultad para eliminar completamente el disolvente es la principal desventaja de este método.

1.3.4.4.- Métodos de fusión y evaporación

En este método se combinan los procesos de fusión y evaporación del solvente. Esta técnica consiste en disolver el principio activo en un disolvente orgánico adecuado y después incorporar la disolución directamente sobre el

vehículo previamente fundido, que es posteriormente evaporado (Chiou y Riegelman, 1971).

Este método reúne tanto las ventajas del método de fusión como las del método de evaporación del disolvente. Sin embargo, puede afectar al polimorfismo del fármaco.

1.3.5. Mecanismos por los que las dispersiones sólidas producen incremento en la velocidad de disolución del fármaco.

Existen distintas explicaciones sobre la mejora de la velocidad de disolución que las DS logran conseguir.

- Reducción del tamaño de partícula.

Un incremento en el área superficial lleva a incrementos en la velocidad de disolución mejorando la biodisponibilidad de los principios activos poco solubles en agua (Prabhu, et al., 2005).

- Sekiguchi y Obi (Sekiguchi, 1961) demostraron que sus dispersiones sólidas presentaban un aumento en la velocidad de disolución por formación de un eutéctico. En los sistemas eutécticos, la reducción del tamaño de partícula se debe a una cristalización simultánea del fármaco y el vehículo y en ellos el crecimiento de los cristales se ve retardado por la lenta migración y la dificultad de la nucleación en un medio viscoso (Attia, et al., 1982).
- Partículas con mejor humectabilidad: la mejora en la solubilidad de los fármacos está relacionada con la mejora de la humectabilidad de los mismos, y esta mejora en la humectabilidad está verificada en las DS (Karavas, et al., 2016). El vehículo utilizado en las DS puede disminuir la tensión superficial del medio de disolución permitiendo un incremento en la humectabilidad de las partículas.
- Partículas con mayor porosidad. Cuanto mayor sea la porosidad de las partículas mayores velocidades de disolución se alcanzarán.

Las partículas en las DS tienen un mayor grado de porosidad, éste depende de las características del vehículo. Los polímeros lineales producen dispersiones sólidas con partículas más grandes y porosas comparadas con las DS elaboradas con polímeros reticulares (Ghaderi, et al., 1999; Vasconcelos, et al., 2007).

- Fármacos en estado amorfo. El fármaco puede obtenerse en un estado distinto al inicial en el proceso de elaboración de DS encontrándose polimorfos, amorfos, solvatos e incluso complejos. Los fármacos en estado amorfo presentan una mayor solubilidad ya que no es necesaria energía para romper la red cristalina durante el proceso de disolución (Pokharkar, et al., 2006; Taylor y Zografi, 1997).
- Disminución de la agregación y aglomeración. En ocasiones al micronizar un principio activo se obtiene una disminución en la velocidad de disolución del mismo en contra de lo esperado. Esto es debido a que en estos casos aumenta su tendencia agregarse. Y es esta tendencia a la agregación lo que se evita con la formación de las DS. (Torrado, 1994).
- Disminución de la energía de activación. Algunas teorías explican el aumento en la velocidad de disolución de las DS por un descenso en la energía de activación de la disolución.
En la mayoría de los casos no es un único factor el responsable en la mejora de la velocidad de disolución de las DS sino la suma de varios de ellos. De la experiencia de los distintos investigadores se desprende que los principales factores que controlan la liberación de estos sistemas son el porcentaje de fármaco-vehículo y la naturaleza física de la DS. (Torrado, 1994).
- Formación de coacervatos.
La formación de coacervatos en la superficie del coprecipitado y el solvente también puede explicar el aumento de la velocidad de

disolución para algunos coprecipitados de bajo peso molecular (Draguet-Brughmans, et al., 1979; Badawi y El-Sayed, 1980).

En el caso de que el vehículo se disuelva llevando disperso el medicamento en el medio de disolución, la cesión del medicamento (v_m) es dependiente del producto de la velocidad de disolución del vehículo (v_v) por la proporción de medicamento presente (concentración del medicamento/concentración del vehículo).

1.3.6. Ventajas e inconvenientes de las dispersiones sólidas

Ventajas de las dispersiones sólidas (Ballesteros y Guzmán, 1997).

- Cuando un fármaco poco soluble en agua se administra por vía oral, la velocidad de absorción se encuentra controlada por su velocidad de disolución en el tracto gastrointestinal, por lo que la utilización de los métodos farmacotécnicos de exaltación de la solubilidad, como es el caso de las DS, mejora la biodisponibilidad de los medicamentos poco solubles (aumenta su absorción, al aumentar su solubilidad), y en algunos casos con el empleo de este tipo de formulación galénica se puede disminuir la dosis terapéutica del principio activo.
- Los vehículos de las DS pueden tener propiedades específicas que dan nuevas ventajas a estas formulaciones, por ejemplo el polietilenglicol protege a ciertos productos de su descomposición por la saliva, permitiendo su administración por vía bucal; DS de determinados antiinflamatorios no esteroídicos formulados con polietilenglicol y polivinilpirrolidona disminuyen los efectos ulcerogénicos de estos principios activos.
- Utilizando vehículos de baja solubilidad se pueden obtener formulaciones de cesión sostenida. Las combinaciones entre polímeros solubles e insolubles se han utilizado también en las proporciones

adecuadas para modular la liberación de ciertos principios activos de forma controlada.

- Las dispersiones se pueden someter a tratamientos como el de la compresión, lo que las hace más manejables, siempre que se seleccione el tamaño de partícula adecuado que no afecte a la estabilidad de la dispersión.

Desventajas de las dispersiones sólidas

Las principales desventajas de las DS están relacionadas con su inestabilidad. Algunas de estas formulaciones han mostrado cambio en la cristalinidad y disminución de la velocidad de disolución transcurrido un tiempo desde su preparación (Van den Mooter, et al., 2006).

Los mecanismos que explican estos cambios en la cristalinidad del principio activo y la disminución en su solubilidad son:

- Absorción de humedad.
- Separación de fases.
- Crecimiento cristalino.
- Cambio de la forma cristalina metaestable a estable.

1.4. Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC)

1.4.1. Características generales

La USP42 describe la L-HPC como un hidroxipropiléter de celulosa bajamente sustituido. En comparación con la hidroxipropilcelulosa, la hidroxipropilcelulosa de baja sustitución tiene sólo una pequeña proporción de los tres grupos hidroxilo libres de cada subunidad de glucosa convertida a hidroxipropiléter.

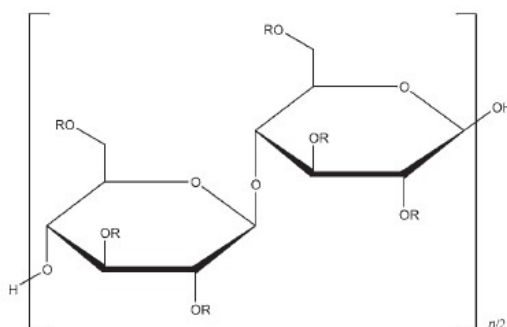


Figura 1.4: Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC), donde $R = H$ ó $[CH_2CH(CH_3)O]_mH$. (Rowe, et. al, 2006).

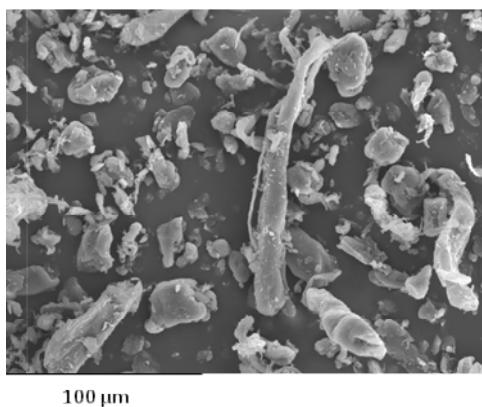


Figura 1.5: Microfotografía de L-HPC ampliada 500x.

La L-HPC se presenta como un polvo blanco o gránulos de color blanco amarillento. Es inodoro o tiene un ligero olor característico, y es insípido (Rowe et al., 2006).

Cuando se seca a 105°C durante 1 hora, no contiene menos del 5,0% y no más del 16,0% de grupos hidroxipropoxi ($-OCH_2CHOHCH_3$). (USP 42, 2019). La L-HPC está comercialmente disponible en varios grados diferentes que tienen diferentes tamaños de partícula y diferentes niveles de sustitución.

1.4.2. Aplicaciones en tecnología farmacéutica

La L-HPC se usa ampliamente en las formas sólidas orales. Se utiliza principalmente como disgregante, y como aglutinante para comprimidos y gránulos en granulación húmeda o seca. Se ha utilizado en la preparación de comprimidos de rápida disgregación producidos por métodos de compresión directa (Guo, et al., 1998; Alvarez-Lorenzo, et al., 2000; Gulsun, et al., 2017).

Además, la L-HPC se ha utilizado como aglutinante/disgregante en procesos de fabricación de comprimidos, en pequeñas proporciones (2,5-5%) en combinación con otros excipientes como celulosa microcristalina (Kawashima et al, 1993) o etilcelulosa (Quintena et al., 2009) donde juega un especial papel el tamaño de partícula en la disgregación y las características de velocidad de liberación del fármaco desde el comprimido.

El aumento de la cantidad de L-HPC en la formulación da lugar a mayores tasas de liberación del fármaco debido a las propiedades de hinchamiento de la L-HPC (Quintena et al., 2009).

La L-HPC también se utiliza para preparar pellets por extrusión / esferonización (Kleinebudde, 1993). Se recomienda un bajo tamaño de partículas y un alto contenido de hidroxipropilo para producir esferas redondas y rápida disolución.

Por otra parte, el uso de L-HPC en tecnología farmacéutica se ha extendido a la formulación de DS, utilizando este polímero como matriz (Takeuchi, et al., 2005; García-Rodríguez et al., 2010 y de la Torre-Iglesias et al., 2014).

Hay una serie de grados que tienen diferentes tamaños de partículas y niveles de sustitución. El LH-11 tiene las partículas fibrosas más largas, y se usa típicamente como agente anticapping y disgregante para la compresión directa. La LH-21 es menos fibrosa y se utiliza como aglutinante y disgregante para la fabricación de comprimidos a través del proceso de granulación húmeda. La LH-31 tiene un grado de partículas pequeñas y se utiliza especialmente en la extrusión para producir gránulos, ya que tiene un tamaño de partícula pequeño que es mejor para pasar el cribado. La LH-B1 es el grado no fibroso de alta densidad diseñado para granulación en lecho fluido, y puede utilizarse para compresión directa y /o formulaciones con alto contenido de L-HPC. Grados de sustitución inferiores LH-22 y LH-32 se pueden utilizar para una mejor capacidad de disgregación, dependiendo de las características de los principios activos (Rowe et al., 2006). El contenido normal de L-HPC en una formulación es de aproximadamente del 5 al 50%.

1.4.3. Propiedades

- ✓ Acidez / alcalinidad: pH = 5,0–7,5 para una suspensión acuosa al 1% p / v.
- ✓ Contenido en grupos hidroxipropoxi:
 - LH-11: 11%.
 - LH-21: 11%.
 - LH-B1: 11%.
 - LH-31: 11%.
 - LH-22: 8%.
 - LH-32: 8%.
- ✓ Ángulo de reposo se encuentra entre 40 y 53° dependiendo del grado de sustitución.
- ✓ Contenido en cenizas: ≤0,5%. (USP42-NF37).
- ✓ Densidad 1,3 g/ cm³.
- ✓ Punto de fusión: 290°C.
- ✓ Contenido de humedad: 8% a una humedad relativa del 33% y 38% a una humedad relativa del 95%.
- ✓ Distribución de tamaño de partícula:
 - LH-11: tamaño medio 50 mm; no más del 2%, >150 mm;
 - LH-21 y LH-22: tamaño promedio 40 mm; no más del 10%, >75 mm;
 - LH-31 y LH-32: tamaño promedio de 25 mm; no más del 50%, >45 mm.
- ✓ Solubilidad: Prácticamente insoluble en etanol (95%) y en éter. Se disuelve en una solución de hidróxido de sodio (1 en 10) y produce una solución viscosa. En agua es insoluble, se produce hinchamiento (Rowe et al., 2006).

1.4.4. Método de Fabricación

La L-HPC se fabrica por reacción de celulosa alcalina con óxido de propileno a temperatura elevada. Tras la reacción, el producto se recristaliza por neutralización, lavado y molido (Rowe et al., 2006).

1.4.5. Seguridad

La L-HPC se considera generalmente un material no tóxico y no irritante. Los estudios de toxicidad en animales no mostraron efectos adversos en ratas alimentadas por vía oral con una dosis de 6 g / kg / día durante 6 meses. No se observaron efectos teratogénicos en conejos y ratas alimentadas con 5 g / kg / día LD50 (rata, oral):> 15 g /kg (Kitagawa, et. al, 1976; Kitagawa, et al., 1978).

Por otra parte según la EFSA, (European Food Safety Authority) 2018, no hay preocupación sobre la seguridad en el uso de L-HPC para los usos y dosis propuestos (2 mg/kg peso/día).

La L-HPC se encuentra incluida en la base de datos de ingredientes inactivos de la FDA (Food and Drug Administration) (cápsulas orales, comprimidos, pellets). Así mismo, está aprobada para su uso en productos farmacéuticos en Europa, Japón, Estados Unidos y otros países. También está incluida en la lista canadiense de ingredientes no medicinales aceptables (Rowe et al., 2006).

1.5. Laurilsulfato sódico (LSS)

1.5.1. Características generales

El LSS se presenta en forma de cristales o polvo de color blanco o amarillo pálido (RFE, 2015), con sabor amargo y un ligero olor a sustancias grasas (Rowe et al., 2006).

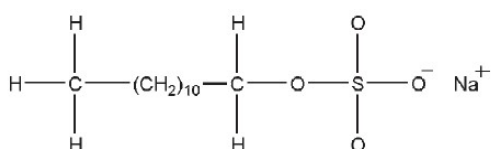


Figura 1.6: Fórmula estructural del laurilsulfato sódico. (Rowe, et al, 2006).

1.5.2. Aplicaciones en tecnología farmacéutica

El (LSS) es un surfactante aniónico empleado en gran variedad de formulaciones farmacéuticas no parenterales y en cosmética: (Rowe et al., 2006).

- Emulsionante aniónico, forma bases autoemulsionantes con alcoholes grasos en una concentración del 0,5–2,5%.
- Detergente en champús en una concentración del 10%.
- Limpiador cutáneo al 1%.
- Solubilizante en concentraciones mayores a la concentración micelar crítica en concentraciones $> 0,0025\%$.
- Lubricante en comprimidos, al 1,0–2,0%.
- Agente humectante en dentífricos, al 1,0–2,0%.
- Purificación de ácidos nucleicos, gracias a su capacidad para alterar rápidamente la arquitectura del tejido e inhibir tanto la actividad de la ARNasa como la desoxirribonucleasa (DNasa). Normalmente se prepara como una solución madre del 10% o del 20% (p / v) en una concentración al 0,1% a 0,5% (Farrell, 2010).
- En los últimos años ha encontrado aplicación en técnicas electroforéticas analíticas (Kaschak, et al., 2011; Kia-Ki, et al., 1986; Lee, et al., 2014; Kubota, et al., 2017).

1.5.3. Estabilidad y condiciones de almacenamiento.

El LSS es estable en condiciones normales de almacenamiento. Sin embargo, en solución, bajo condiciones extremas, es decir, pH 2,5 o menor, sufre hidrólisis a alcohol laurílico y sodio bisulfato (Farrell, 2010).

Por tanto, debe almacenarse en un recipiente bien cerrado alejado de agentes oxidantes fuertes en un lugar fresco y seco.

1.5.4. Método de Fabricación

El LSS se prepara por sulfatación de alcohol laurílico, seguido de neutralización con carbonato de sodio.

1.5.6. Propiedades

- Peso molecular: 288,378 g/mol.
- Acidez / alcalinidad: pH = 7,0–9,5 (solución acuosa al 1% p / v).
- Concentración micelar crítica: 8,2 mmol / L (2,365 g / L) a 20°C.
- Densidad: 1,07 g / cm³ a 20°C.
- Valor de HLB: aproximadamente 40.
- Tensión interfacial: 11,8 mN/ m para una solución al 0,05% p/v (líquido no acuoso no especificado) a 30°C.
- Tensión superficial: 25,2 mN / m para una solución acuosa al 0,05% p / v a 30°C.
- Tiempo de humectación: 118 segundos (solución acuosa al 0,05% p / v) a 30°C.
- Punto de fusión: 204–207°C.
- Contenido en humedad: 45%, el lauril sulfato de sodio no es higroscópico.
- Solubilidad: Fácilmente soluble en agua (100000 mg/L), dando una solución opalescente; prácticamente insoluble en cloroformo y éter. parcialmente soluble en etanol al 96 por ciento (Rowe et al., 2006; RFE, 2015).

1.5.7. Seguridad

El LSS es un tensioactivo con efectos tóxicos agudos moderados. El contacto con la piel puede producir dermatitis de contacto. La inhalación prolongada de LSS puede producir sensibilización pulmonar, resultando en disfunción de las vías respiratorias.

Se han llevado a cabo estudios en animales que indican que la administración intravenosa causa efectos tóxicos pulmonares, renales y hepáticos, por lo que no está indicado para la administración por dicha vía.

Las reacciones adversas más frecuentes derivadas de su uso en cosméticos y como excipiente en medicamentos son la irritación cutánea y ocular después de la aplicación tópica.

Los síntomas tras intoxicación pueden incluir picazón, lagrimeo, enrojecimiento, hinchazón y visión borrosa, daños oculares irreversibles, incluyendo ceguera. Irritación de la piel, con posible enrojecimiento y dolor.

La dosis oral letal humana probable es 500–5000 mg/ kg de peso corporal.

LD50 (ratón, IP): 250 mg/ kg.

LD50 (ratón, IV): 120 mg/kg.

LD50 (rata, oral): 1200 mg/ kg.

LD50 (rata, dérmica): > 2000 mg/ kg.

LD50 (rata, IP): 210 mg/ kg.

LD50 (rata, IV): 120 mg/ kg.

No hay datos disponibles para indicar que el Laurilsulfato sódico presente a más del 0,1% es mutagénico o genotóxico.

No se incluye como carcinogénico en las monografías IARC (Rowe et al., 2006).

1.6. Bibliografía

- Adebisi, A.O., Kaialy, W., Hussain, T., Al-Hamidi, H. y Asare-Addo, K. (2016): "Solid-state, triboelectrostatic and dissolution characteristics of spray-dried piroxicam-glucosamine solid dispersions", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, pp. 841-851.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2015). *Real Farmacopea Española (RFE)*. 5ª ed. Madrid.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2016). *Prospecto Reusin®*. Madrid.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2017). *Ficha técnica Inacid®*. Madrid.
- Alvarez-Lorenzo, C., Gómez- Amoza, J.L., Martínez-Pacheco, R., Souto, C., Concheiro A. (2000): "Evaluation of low-substituted hydroxypropylcelluloses (L-HPCs) as fillerbinders for direct compression", *International Journal of Pharmaceutics*, 197(1–2), pp. 107-116.
- Attia, M.A.; Aboutaleb, A.E.; Habib, F.S. (1982): "A study on the dissolution of diazepam from its solid dispersiones and coprecipitates in the presence of various concentrations of non-ionic surfactants", *Pharmazie*, 37, pp. 274-77.
- Badawi, A.A., El-Sayed, A.A. (1980), *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5, pp. 492-497.
- Bakatselou, V., Oppenheim, R.C. y Dressman, J.B. (1991): "Solubilization and wetting effects of bile salts on the dissolution of steroids", *Pharmaceutical Research*, 8, pp. 1461-1469.
- Betageri G.V. y Makarla K.R. (1995): "Enhancement of dissolution of glyburide by solid dispersion and lyophilization techniques", *International Journal of Pharmaceutics*, 126, pp. 155-60.

- Bjarnason, I., Scarpignato, C., Holmgren, E., Olszewski, M., Rainsford, K.D. y Lanás, A. (2018): "Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs", *Gastroenterology*, 154(3), pp. 500-514.
- Brunton L.L. (Ed.). (2011). *Goodman & Gilman: Bases farmacológicas de la terapéutica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.L., Madrid.
- Chen, A. Z., Li, Y., Chay, F. T., Lau, T. Y., Hu, J.Y., Zhao, Z. y Mok, D. K. (2009): "Microencapsulation of puerarin nanoparticles by poly(L-lactide) in a supercritical CO₂ process", *Acta Biomaterialia* 2009, 12, pp. 26-32.
- Chiou, W.L. y Riegelman S. (1969): "Preparation and dissolution characteristics of several fast-release solid dispersions of griseofulvin", *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 58(12), pp.1505-1510.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (2017). *Portalfarma*. Disponible en: <https://www.portalfarma.com/Profesionales/DestacadosProfesionales/Paginas/Interacciones-Medicamentos.aspx> [Consultado 17-12-2018].
- de la Torre-Iglesias, P.M., García-Rodríguez, J.J., Torrado-Durán, G., Torrado-Durán. S., Torrado-Santiago, S. y Bolás-Fernández, F. (2014): "Enhanced bioavailability and anthelmintic efficacy of mebendazole in redispersible microparticles with low-substituted hydroxypropylcellulose", *Drug Design, Development and Therapy*, 8, pp. 1467-1479.
- Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Harris, D., Beck, T.N.C. (2001): "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles", *Polymer*, 42, pp.261-272.
- DiNunzio, J.C., Brough, C., Miller, D.A., Williams R.O. y McGinity, J.W. (2010): "Applications of KinetiSol dispersing for the production of plasticizer free amorphous solid dispersions", *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 40, pp. 179-187.
- Dong, Z., Chatterji, A., Sandhu, H., Choi, D.S., Chokshi, H. y Shah N. (2008): "Evaluation of solid state properties of solid dispersions prepared by hot-melt extrusion and solvent co-precipitation" *International Journal of Pharmaceutics*, 355(1-2), pp. 141-149.

- Draguet-Brughmans, M., Azibi, M. y Bouche, R. (1979): "Solubilité et vitesse de dissolution du meprobamate; des cas significatifs", Journal de pharmacie de Belgique, 34, pp. 267-271.
- Dreischulte, T., Morales, D.R., Bell, S. y Guthrie, B. (2015): "Combined use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with diuretics and/or renin-angiotensin system inhibitors in the community increases the risk of acute kidney injury", Kidney International, 88(2), pp. 396-403.
- El-Egakey, M.A., Soliva, M. y Speiser, P. (1971): "Hot extruded dosage forms. I. Technology and dissolution kinetics of polymeric matrices", Pharm. Acta Helv., 46, pp. 31-52.
- El-Yazbi, A.F., Eid, A.H. y El-Mas M.M. (2018): "Cardiovascular and renal interactions between cyclosporine and NSAIDs: Underlying mechanisms and clinical relevance", Pharmacological Research, 129, pp. 251-261.
- Farrell R.E. (2010): RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization., Estados Unidos: Academic Press.
- Fitriani, L., Haqi, A. y Zaini, E. (2016): "Preparation and characterization of solid dispersion freeze-dried efavirenz - polyvinylpyrrolidone K-30", Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 7(3), pp. 105-109.
- Gallagher, P.M., Coffey, M.P., Krukonis, V.J., Klasutis, N. (1989): "Gas antisolvent recrystallization: new process to recrystallize compounds insoluble in supercritical fluids", en Supercritical fluid science and technology, ACS Symposium, American chemical society, Washington, J.M.L. Penniger.
- Gaoa, N., Guob, M., Fub, Q. y Heb, Z. (2017): "Application of hot melt extrusion to enhance the dissolution and oral bioavailability of oleanolic acid", Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 12(1), pp. 66-72.
- García-Rodríguez, J.J., de la Torre-Iglesias, P.M., Vegas-Sánchez, M.C., Torrado-Durán, S., Bolás-Fernández, F. y Torrado-Santiago, S. (2011): "Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: Improved anthelmintic activity", International Journal of Pharmaceutics, 403(1-2), pp. 23-28.

- Gennaro, A. R. (Ed.). (2003): Remington: farmacia, Madrid, Panamericana.
- Ghaderi, R., Artursson, P. y Carlfors, J. (1999): "Preparation of biodegradable microparticles using solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS)," *Pharmaceutical Research*, 16(5), pp. 676-681.
- Grau M.V., Baron J.A., Langholz B., Karagas M., Greenberg E.R., Stukel T.A. y Mandel J.S. (2006): "Effect of NSAIDs on the recurrence of nonmelanoma skin cancer", *International Journal of Cancer*, 119, pp. 682–686.
- Gulsun, T., Ozturk, N., Kaynak, M.S., Vural, I., Sahin, S. (2017): "Preparation and evaluation of furosemide containing orally disintegrating tablets by direct compression", *Pharmazie*, 72(7), pp. 389-394.
- Guo, J.H., Skinner, G.W., Harcum, W.W. y Barnum, P.E. (1998): "Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers", *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(6), pp 254-261.
- Herbrink, M., Schellens, J.H.M. y Beijnen, J.H. (2017): "Bastiaan Nuijen Improving the solubility of nilotinib through novel spray-dried solid dispersions", *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1–2), pp. 294-302.
- Holm, P., Buur, A., Elema, M., Møllgaard, B., Holm, J. y Schult, K. (2007): "Controlled agglomeration", US Patent 7217431.
- Hu, X.Y., Lou, H. y Hageman M. (2018): "Preparation of lapatinib ditosylate solid dispersions using solvent rotary evaporation and hot melt extrusion for solubility and dissolution enhancement", *International Journal of Pharmaceutics*, 552(1–2), pp. 154-163.
- Hughey, J.R., Keen, J.M., Miller, D.A., Brough, C. y McGinity J.W. (2012): "Preparation and characterization of fusion processed solid dispersions containing a viscous thermally labile polymeric carrier", *International Journal of Pharmaceutics*, 438, pp. 11-19.
- Kanaujia, P., Lau, G., Ng, W.K., Widjaja, E., Hanefeld, A., Fischbach, M., Maio, M. y Tan, R.B. (2011): "Nanoparticle formation and growth during

- in vitro dissolution of ketoconazole solid dispersión”, Journal of Pharmaceutical Sciences, 100, pp. 2876–2885.
- Karanth, H., Shenoy, V. S. y Murthy, R. R. (2006): “Industrially feasible alternative approaches in the manufacture of solid dispersions: A technical report”, AAPS PharmSciTech., 7(4), pp. 31-38.
 - Karata, A. Yüksel, N. y Baykara, T. (2005): “Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol”, Il Farmaco, 60, 777–782.
 - Karavas, E., Ktistis, G., Xenakis, A., Georgarakis, E. (2006): “Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone”, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 63(2), pp. 103-114.
 - Kaschak, T., Boyd, D. y Yan B. (2011): “Characterization of glycation in an IgG1 by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate and mass spectrometry”, Analytical Biochemistry, 417(2), pp. 256-263.
 - Kawashima, Y., Takeuchi, H., Hino, T., Niwa, T., Lin, T.L., Sekigawa, F. y Ohia M. (1993): “The effects of particle size, degree of hydroxypropyl substitution and moisture content of low-substituted hydroxypropylcellulose on the compactability of acetaminophen and the drug release rate of the resultant tablets”, STP pharma sciences, 3, pp. 170-177.
 - Kitagawa, H., Saito, H., Yokoshima, T. (1976): “Absorption, distribution, excretion and metabolism of 14C-hydroxypropylcellulose of low-substitution”, Pharmacometrics, 12, pp. 33–39.
 - Kitagawa, H., Saito, H. (1978): “General pharmacology of hydroxypropylcellulose of low substitution (L-HPC)”, Pharmacometrics, 16, pp. 299–302.
 - Kia-Ki, H., Richard, C., Gui-Yi, Z. y Delacourte, A. (1986): “Sequence homology analysis of proteins by chemical cleavages: Using a mono and two dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”, International Journal of Biochemistry, 18(12), pp. 1073-1082.
 - Kleinebudde, P. (1993): “Application of low substituted hydroxypropylcellulose (L-HPC) in the production of pellets using

- extrusion/spheronization”, International Journal of Pharmaceutics, 96, (1–3), pp. 119-128.
- Krukoni, V. (1984): “Supercritical fluid nucleation of difficult-to-comminute solids”, en AiChE Annual Meeting, San Francisco.
 - Kubota, K., Kobayashi, N., Yabuta, M., Ohara, M. y Otsuka, K. (2017): “Identification and characterization of a thermally cleaved fragment of monoclonal antibody-A detected by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 140, pp. 98-104.
 - Lee, M.C., Wu, K.S., Nguyen, T.N. y Sun B. (2014): “Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for direct quantitation of protein adsorption”, Analytical Biochemistry, 465, pp. 102-104
 - Lichtenberger L.M., Phan T., Fang D. y Dial E.J. (2018): “Chemoprevention with phosphatidylcholine non-steroidal anti-inflammatory drugs *in vivo* and *in vitro*”, Oncology Letters, 15(5), pp.6688–6694.
 - Lokamatha, K.M., Shanta Kumar, S.M. y Rao, R. (2011): “Enhancement of solubility and dissolution rate of nevirapine by solid dispersion technique using dextran: preparation and *in vitro* evaluation”, International Journal of Pharmaceutical Research and Development, 2(12), pp. 1-8.
 - Majerik, V., Charbit, G., Badens, E., Horváth, G., Szokonya, L., Bosc, N. y Teillaud, E. (2007) “Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation”, The Journal of Supercritical Fluids, 40, pp. 101–110.
 - Majerik, V., Charbit, G., Badens, E., Horváth, G., Szokonya, L., Bosc, N. y Teillaud, E. (2007): “Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation”, The Journal of Supercritical Fluids, 40 (101–110).
 - Mann, A.K.P., Schenck, L., Koynov, A., Rumondor, A.C.F., Jin, X., Marota, M., Dalton, C. (2018): “Producing Amorphous Solid Dispersions via Co-Precipitation and Spray Drying: Impact to Physicochemical and Biopharmaceutical Properties”, Journal of Pharmaceutical Sciences, 107(1), pp. 183-191.

- Motallae, S., Taheri, A. y Homayouni A. (2018): "Preparation and characterization of solid dispersions of celecoxib obtained by spray-drying ethanolic suspensions containing PVP-K30 or isomalt", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, pp. 188-196.
- Pokharkar, V. B., Mandpe, L. P., Padamwar, M. N., Ambike, A. A., Mahadik, K. R. y Paradkar, A. (2006): "Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low T_g drug", *Powder Technology*, 167(1), pp. 20-25.
- Prabhu, S. Ortega, M. y Ma, C. (2005): "Novel lipidbased formulations enhancing the *in vitro* and permeability characteristics of a poorly watersoluble model drug, piroxicam", *International Journal of Pharmaceutics*, 301(1-2), pp. 209-216.
- Qi, S., Gryczke, A., Belton, P. y Craig D.Q. (2008): "Characterisation of solid dispersions of paracetamol and EUDRAGIT® E prepared by hot-melt extrusion using thermal, microthermal and spectroscopic analysis", *International Journal of Pharmaceutis*, 354, pp. 158-167.
- Quintena, T., Gonnissena, Y., Adriaensa, E., De Beera, T., Cnuddeb V., Masschaeleb B., Van Hoorebekeb, L., Siepmannnc, J., Remona, J.P. y Vervaeta, C. (2009): "Development of injection moulded matrix tablets based on mixtures of ethylcellulose and low-substituted hydroxypropylcellulose", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3-4), pp. 207-216.
- Rosenberg, J. y Breitenbach, J. (1998): "The production of active substance compositions in the form of a solid solution of the active substance in a polymer matrix, and active substance compositions produced by this process". US Patent 5741519.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J. y Quinn, M.E. (2006): *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6^a ed. Londres: Pharmaceutical Press.
- Sekiguchi, K. y Obi N. (1961): "Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 9, pp. 866-872.

- Sekiguchi, K. y Obi, N. (1964): "Studies on absorption of eutectic mixture. II. Absorption of fused conglomerates of chloramphenicol and urea in rabbits", Chemical and Pharmaceutical Bulletin 12, pp. 134–144.
- Sethia, S. y Squillante, E. (2002): "Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method", Journal of Pharmaceutical Sciences, 91, pp. 1948–1957.
- Shristi B., Neha J., Indu B.P. y Rajesh G. (2012): "A review on some Indian medicinal plants for antiulcer activity", Journal of Scientific Research on Pharmacy, 1, pp. 6–9.
- Simonelli, A., Mehta, S.C., Higuchi y W.I. (1969): "Dissolution rates of high energy polyvinylpyrrolidone (PVP)-sulfathiazole coprecipitates", Journal of Pharmaceutical Sciences, 58, pp. 538-549.
- Smith J. B. y Willis A. L. (1971): "Aspirin Selectively inhibits prostaglandin production in human platelets", Nature New Biology, 231, pp. 235-237.
- Somasundaram R. y Herlyn M. (2014): "Indomethacin to the rescue of TRAIL-resistant melanomas", Journal of Investigative Dermatology, 134(5), pp. 1198–1199.
- Subramaniam, B., Rajewski, R.A. y Snavely, K. (1997): "Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide", Journal of Pharmaceutical Sciences, 86, pp. 885–890.
- Suleyman H., Albayrak A., Bilici M., Cadirci E. y Halici Z. (2010): "Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers", Inflammation, 33(4), pp. 224-234.
- Sweetman, S. C. (Ed.). (2011): Martindale: The Complete Drug Reference, Londres, Pharmaceutical Press.
- Takeuchi, H., Nagira, S., Tanimura, S., Yamamoto, H. y Kawashima, Y. (2020): "Tabletting of solid dispersion particles consisting of indomethacin and porous silica particles", Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 53(5), pp. 487-491.
- Taylor, L. S. y Zografi, G. (1997): "Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions", Pharmaceutical Research, 14(12), pp. 1691-1698.

- Tho, I., Liepold, B., Rosenberg, J., Maegerlein, M., Brandl, M. y Fricker, G. (2010): "Formation of nano/micro-dispersions with improved dissolution properties upon dispersion of ritonavir melt extrudate in aqueous media", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, pp. 25–32.
- Timko, R.J. y Lordi, N.G. (1979): "Thermal characterization of citric acid solid dispersions with benzoic acid and phenobarbital", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, pp. 601–605.
- USP 42 (United States Pharmacopoeia 42). 2019.
- Uwai, Y., Saito, H. y Ichilnui, K. (2000): "Interaction between methotrexate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in organic anion transporter", *European Journal of Pharmacology*, 409(1), pp.31-36.
- Van den Mooter G., Weuts I., De Ridder T. y Bleton N., (2006): "Evaluation of Inutec SP1 as a new carrier in the formulation of solid dispersions for poorly soluble drugs", *International Journal of Pharmaceutics*, 316, pp. 1–6.
- van Drooge, D.J., Hinrichs, W.L., Visser, M.R. y Frijlink, H.W. (2006): "Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques", *International Journal of Pharmaceutics*, 310, pp. 220–229.
- Vane J. R. (1971): "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs", *Nature New Biology*, 231, pp. 232-235.
- Vasconcelos, T., Sarmiento, B. y Costa, P. (2007): "Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs", *Drug Discovery Today*, 12, pp. 1068-1075.
- Verreck, G., Chun, I., Rosenblatt, J., Peeters, J., Van Dijk, A., Mensch, J., Noppe, M., y Brewster, M. E. (2003): "Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer", *Journal of Controlled Release*, 92(3), pp. 349-60.
- Wang, X., Michel, A. y Van den Mooter, G. (2005): "Solid state characteristics of ternary solid dispersions composed of PVP VA64, Myrj

- 52 and itraconazole”, International Journal of Pharmaceutics, 303, (1-2), pp. 54-61.
- Won, D.-H., Kim M.S., Lee S., Park J.S. y Hwang S.J. (2005): “Improved physicochemical characteristics of felodipine solid dispersion particles by supercritical anti-solvent precipitation process”, International Journal of Pharmaceutics, 301, pp. 199–208.
 - Yao, W.W., Bai, T.C., Sun J.P. y Cheng-Wen, Z. (2005): “Thermodynamic properties for the system of silybin and poly(ethylene glycol) 6000”, Thermochimica Acta, 437, pp. 17–20.
 - Zallen, R. (2008): The Physics of Amorphous Solids, Nueva York, John Wiley and Sons.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

2. Objetivo y planteamiento

El objetivo de esta tesis es evaluar la capacidad de la L-HPC para alterar la cristalinidad de la IND y aumentar su solubilidad mediante la preparación de DS por el método de liofilización, con el propósito de incrementar la biodisponibilidad oral y tópica de la IND y en consecuencia los efectos terapéuticos a dosis inferiores a las usadas actualmente.

Con el fin de lograr este objetivo, se llevaron a cabo diferentes etapas:

- ✓ Estudio bibliográfico de: IND, L-HPC, LSS, solubilidad de sólidos en líquidos, y DS.
- ✓ Métodos analíticos cuantitativos: puesta a punto y validación.
- ✓ Estudios de caracterización *in vitro* y evaluación *in vivo* de las diferentes DS de IND mediante las siguientes técnicas:
 - Ángulo de contacto.
 - Estudios de velocidad de disolución *in vitro* de las diferentes formulaciones de IND: comparación de las DS y mezclas físicas con la IND materia prima y selección de las formulaciones con mejores perfiles de disolución para llevar a cabo posteriormente los ensayos *in vivo*.
 - SEM.
 - XRPD.
 - DSC.
 - Estudio farmacocinético *in vivo* de las formulaciones seleccionadas para la administración por vía oral.
 - Estudios *in vitro* de velocidad de disolución geles tópicos de IND: comparación de los perfiles de disolución de un gel elaborado con IND y un gel con DS.
 - Estudios *in vivo* de biodisponibilidad tópica: comparación de la biodisponibilidad de IND tras la aplicación de un gel de IND, gel de IND con un promotor de la penetración y un gel de DS.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1. MÉTODOS CUANTITATIVOS.

3.1.1. Introducción

El objetivo de esta etapa es validar los métodos de análisis utilizados para que estos nos ofrezcan confianza y seguridad en los resultados.

El método fue validado según las guías del International Conference of Harmonisation (ICH Q2 (R1): Validación de métodos analíticos) (ICH, 2005).

Para realizar una correcta validación de la IND es necesario calcular los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), y sensibilidad.

3.1.2. Materiales y métodos

3.1.2.1. *Materiales*

3.1.2.1.1. Materias primas y soluciones

Los materiales utilizados para la validación del método analítico han sido:

- Indometacina (IND). Fagron® Iberica SAU, España.
- Tampón pH 4,5 según la USP 42.
- Agua desionizada MiliQ®.

Los materiales utilizados para la elaboración los geles de IND han sido:

- Indometacina (IND). Fagron® Iberica SAU, España.
- Disolución ácido clorhídrico 0,1 N (pH 1,2) según la USP 42.
- Tampón pH 4,5 según la USP 42.
- Tampón pH 6,8 según la USP 42. Tampón pH 4,5 según la USP 42.
- Agua desionizada MiliQ®.
- Hidroxipropil goma guar (en adelante HPG). Fagron® Iberica SAU, España.

3.1.2.1.2. Instrumental

Espectrofotómetro UV-VIS 1,700. Shimadzu[®], Japan.

Espectrofotómetro UV-VIS Jasco V730. Jasco[®], Japón.

Agitador magnético-calefactor. Fischer Scientific[®], Inglaterra.

3.1.2.2. Métodos

3.1.2.2.1. Especificidad

La especificidad es la capacidad del método para evaluar inequívocamente el analito (en nuestro caso IND) en presencia de otros componentes que se supone que pueden estar presentes y que pueden interferir, (impurezas, productos de degradación, etc.).

Para hallar la especificidad del método analítico espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan) se preparó una disolución de placebo de las DS DS-1:0,012:20 y DS-1:0,012:20-NaOH a los diferentes pH (1,2; 4,5 y 6,8), y se realizó un barrido de las mismas para comprobar si aparecía señal de los excipientes a las longitudes de onda a las que se cuantifica la IND por presentar su máximo de absorción (262 nm a pH 1,2 y 266 nm a pH 4,5 y 6,8).

En el caso del espectrofotómetro UV-VIS Jasco V730. Jasco[®], Japón se preparó una disolución de placebo de gel de DS-1:0,12:5-NaOH y otra con un gel de dicha DS a pH 4,5 y al igual que para el anterior espectrofotómetro, se llevó a cabo un barrido de las mismas para comprobar si los excipientes absorbían a la longitud de onda de 266 nm a la que se cuantifica el fármaco.

3.1.2.2.2. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico se define como la capacidad para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra en un rango del procedimiento analítico definido.

Para calcular la linealidad del método espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan) realizamos el siguiente ensayo:

1. Se prepararon tres disoluciones madre de 500 µg/ml de IND, utilizando como disolvente:
 - a. para la validación del método a pH 1,2: una mezcla al 50% de etanol y disolución ácido clorhídrico 0,1 N (pH 1,2) preparada según la USP 42.
 - b. para la validación del método a pH 4,5: tampón pH 4,5 preparado según la USP 42.
 - c. para la validación del método a pH 6,8: tampón pH 6,8 preparado según la USP 42.
2. Con cada disolución se hicieron disoluciones seriadas.
 - a. Para la validación del método a pH 1,2: las disoluciones seriadas fueron de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 µg/ ml utilizando una disolución de ácido clorhídrico 0,1N (pH 1,2).
 - b. Para la validación del método a pH 4,5 las disoluciones seriadas fueron de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 y 10 µg/ ml utilizando tampón pH 4,5.
 - c. Para la validación del método a pH 6,8 las disoluciones seriadas fueron de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 y 10 µg/ ml utilizando tampón pH 6,8.
3. Se analizaron las muestras en el espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu®, Japan).
4. Se determinó la ecuación de la recta para cada dilución seriada (realizadas por triplicado), se calcularon los valores medios y de ahí la ecuación de la recta media.
5. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante las siguientes técnicas:
 - cálculo de la línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados.
 - cálculo del coeficiente de correlación y determinación.
 - cálculo de los intervalos de la ordenada en el origen y de la pendiente, para un intervalo de confianza del 95%.
 - cálculo de la desviación estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen.

Para calcular la linealidad del método analítico espectrofotómetro UV-VIS Jasco® V-730 se llevó el ensayo descrito anteriormente para la validación del método a pH 4,5.

3.1.2.2.3. Exactitud

Se puede definir la exactitud de un método analítico como la capacidad de un método para medir un valor cercano al valor de la magnitud real. Proporciona una indicación de los errores sistemáticos, y se expresa como porcentaje de recuperación o como diferencia entre el valor medio y el aceptado como verdadero, junto con los intervalos de confianza. Se puede calcular a partir de 9 determinaciones sobre, al menos, 3 niveles de concentración.

Para comprobar la exactitud del método de valoración de IND por espectroscopía UV-VIS, utilizando el espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu®, Japan) se realizó lo siguiente:

1. Se prepararon tres disoluciones madre de 500 µg/ml de IND, utilizando como disolvente:
 - a. para la validación del método a pH 1,2: una mezcla al 50% de etanol y disolución ácido clorhídrico 0,1 N (pH 1,2) preparada según la USP 42.
 - b. para la validación del método a pH 4,5: tampón pH 4,5 preparado según la USP 42.
 - c. para la validación del método a pH 6,8: tampón pH 6,8 preparado según la USP 42.
2. Con cada disolución se hicieron disoluciones seriadas.
 - a. Para la validación del método a pH 1,2: las disoluciones seriadas fueron de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 µg/ml utilizando una disolución de ácido clorhídrico 0,1N (pH 1,2).
 - b. Para la validación del método a pH 4,5 las disoluciones seriadas fueron de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 y 10 µg/ ml utilizando tampón pH 4,5.
 - c. Para la validación del método a pH 6,8 las disoluciones seriadas fueron de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 y 10 µg/ ml utilizando tampón pH 6,8.

3. Se analizaron las muestras en el espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan).
4. Se determinó el porcentaje recuperado y el coeficiente de variación.

Para comprobar la exactitud del método de valoración de IND por espectroscopía UV-VIS, en el espectrofotómetro UV-VIS Jasco[®] V-730 se siguió el procedimiento descrito anteriormente para la validación del método a pH 4,5.

3.1.2.2.4. Precisión

La precisión se refiere a la dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud. Proporciona una idea de los errores aleatorios, se puede estudiar la repetibilidad y la precisión intermedia y se expresa como la varianza, desviación estándar y coeficiente de variación de una serie de medidas.

Repetibilidad: expresa la precisión del procedimiento de ensayo cuando se realiza por el mismo analista en cortos intervalos de tiempo, bajo condiciones iguales en cuanto a equipos, reactivos, condiciones experimentales y condiciones ambientales.

Para comprobar la repetibilidad del método analítico en el espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan) se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se preparó 6 veces una solución con igual concentración de IND (0,4 µg/ml a pH 1,2 y 5 µg/ml a pH 4,5 y 6,8).
2. Se analizaron las muestras en el espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan).
3. Se determinó el porcentaje recuperado y el coeficiente de variación.

Para comprobar la exactitud del método de valoración de IND por espectroscopía UV-VIS, en el espectrofotómetro UV-VIS Jasco[®] V-730 se

siguió el procedimiento descrito anteriormente para la validación del método a pH 4,5.

Precisión intermedia: se refiere a las variaciones dentro de un laboratorio, cuando el procedimiento se realiza por distintos analistas, en distintos equipos, en diferentes días, etc.

Para analizar la precisión intermedia de este método utilizando el espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan) se determinó en cada concentración el coeficiente de variación, a partir de los resultados de los dos análisis de 6 muestras diferentes llevados a cabo en distintos días y por distintos analistas.

- ✓ pH 1,2; 4,5 y 6,8
 - El primer día, se prepararon 6 soluciones de 0,4 µg/ ml a pH 1,2 y 5 µg/ ml a pH 4,5 y 6,8, de IND por el analista 1.
 - El segundo día se prepararon 6 soluciones de 0,4 µg/ ml a pH 1,2 y 5 µg/ ml a pH 4,5 y 6,8, de IND por el analista 2.

Para analizar la precisión intermedia de este método utilizando el espectro UV-VIS Jasco[®] V-730 se siguió el mismo método descrito anteriormente, pero únicamente a pH 4,5 ya que es el pH al que se van a realizar las lecturas con este espectrofotómetro.

3.1.2.2.5. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico se expresa en el límite de detección y límite de cuantificación. El límite de detección se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. El límite de cuantificación es la menor concentración de analito (IND) que puede determinarse con precisión y

exactitud. Para calcular la sensibilidad del método se optó por el método más riguroso, que es el método matemático.

Para calcular los límites de detección y cuantificación por este método es necesario conocer la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de calibración obtenida por el método de los mínimos cuadrados. Como desviación estándar de la respuesta se tomó la desviación estándar del blanco.

Se analizaron 10 muestras distintas de blanco cuyas absorbancias se muestran en la tabla 3.7.

3.1.3. Resultados y discusión

3.1.3.1. Espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan)

3.1.3.1.1. Especificidad

En las figuras 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 se pueden observar los espectros de barrido de 6 muestras preparadas a partir de las DS DS-1:0,12:20 y DS 1:0,12:20-NaOH y sus placebos DS-0:0,012:20 y DS-0:0,12:20-NaOH a diferentes pH.

La longitud de onda seleccionada para la realización del ensayo espectrofotométrico de IND fue de 262 nm para los ensayos a pH 1,2 y a 266 nm para los pH de 4,5 y 6,8, ya que a estas longitudes de onda el fármaco presentaba sus máximos de absorción.

Como se observa, la interferencia de los componentes es mínima a las diferentes longitudes de onda, donde la IND muestra sus máximos de absorción, y por tanto, se puede afirmar que el método espectrofotométrico propuesto es específico para la determinación de IND a las longitudes de onda de 262 y 266 nm.

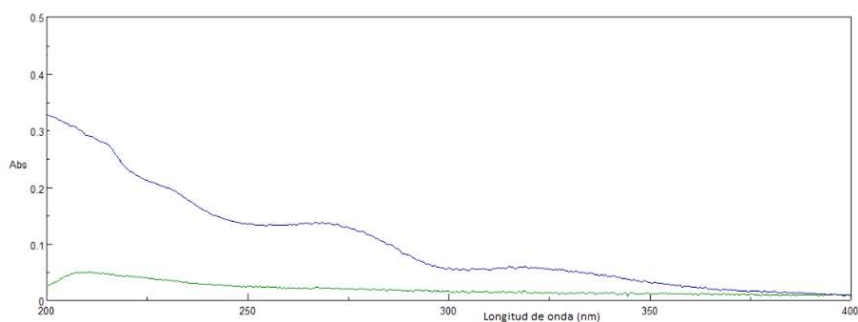


Figura 3.1: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20 (0,6 µg/ml) (—) y DS-0:0,12:20 (placebo) (—) a pH 1,2.

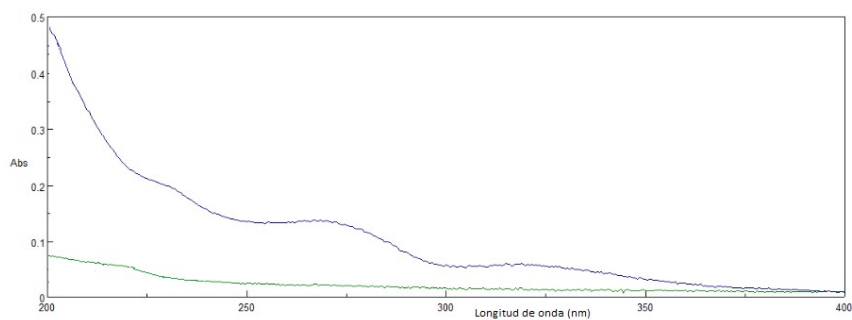


Figura 3.2: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20 (10 µg/ml) (—) y DS-0:0,12:20 (placebo) (—) a pH 4,5.

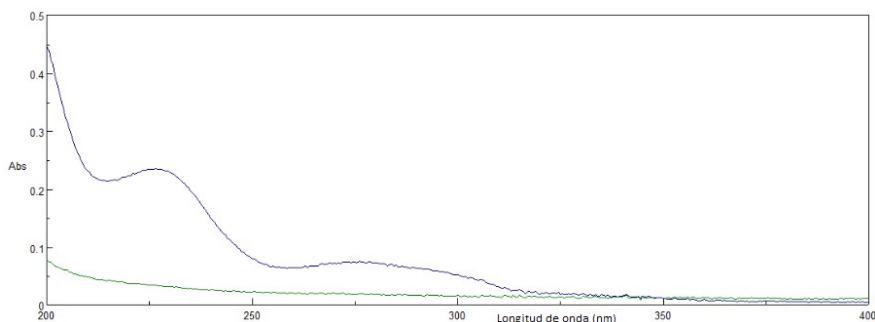


Figura 3.3: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20 (10 µg/ml) (—) y DS-0:0,12:20 (placebo) (—) a pH 6,8.

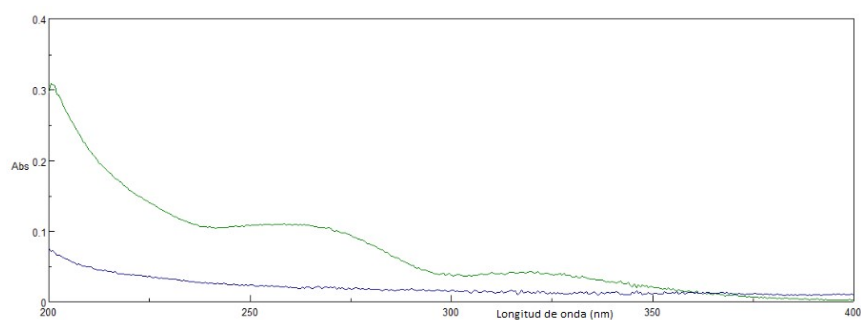


Figura 3.4: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20-NaOH (0,6 µg/ml) (—) y DS-0:0,12:20-NaOH (placebo) (—) a pH 1,2.

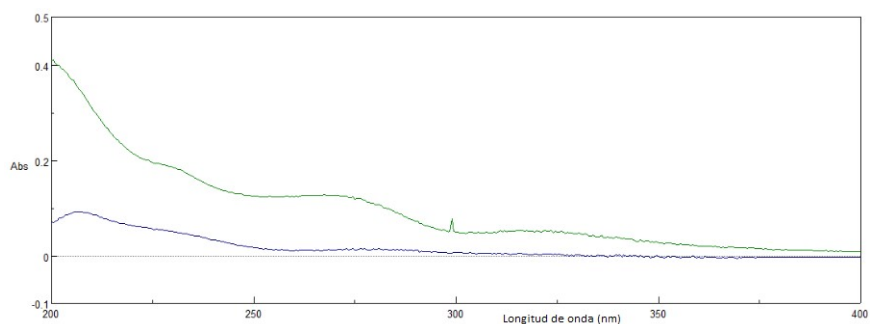


Figura 3.5: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20-NaOH (10 µg/ml) (—) y DS-0:0,12:20-NaOH (placebo) (—) a pH 4,5.

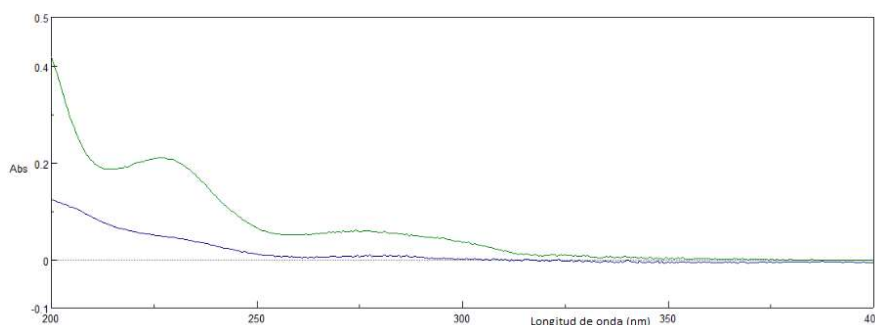


Figura 3.6: Espectro de barrido de DS-1:0,12:20-NaOH (10 µg/ml) (—) y DS-0:0,12:20-NaOH (placebo) (—) a pH 6,8.

3.1.3.1.2. Linealidad

Se determina la linealidad para este método a tres pH, 1,2; 4,5 y 6,8. A partir de una solución madre se realizan 5 diluciones de concentración distinta y se comprueba la linealidad. Los resultados para cada pH se muestran en las tablas 1, 2 y 3 y las rectas de calibrado son:

- pH 1,2

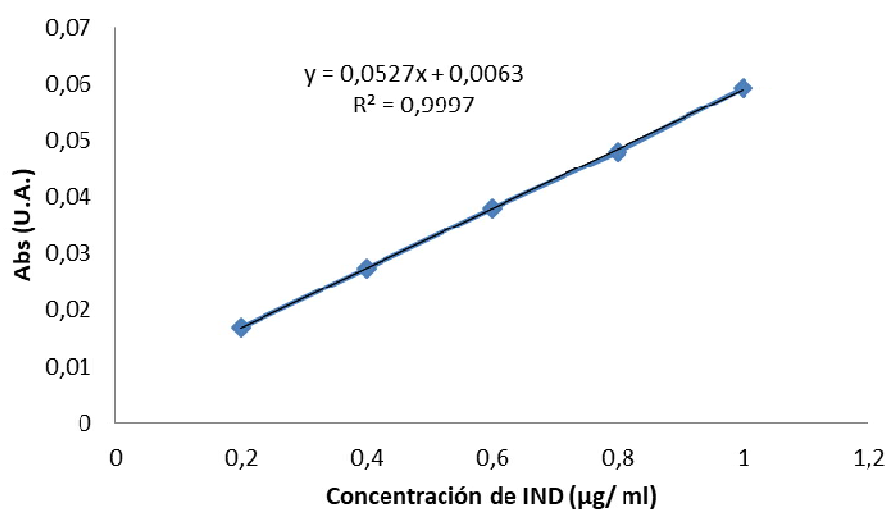


Figura 3.7: Recta de calibrado de IND en pH 1,2.

Longitud de onda: 262 nm.

Concentraciones reales: 0,2 µg/ ml; 0,4 µg/ ml; 0,6 µg/ ml; 0,8 µg/ ml y 1 µg/ ml.

Absorbancia (U.A.)= 0,0063 + 0,0527 C

$r = 0,9998$; $r^2 = 0,9997$

Tabla 3.1: Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ a pH 1,2

Parámetro	Valor
Valor de la ordenada en el origen (a)	0,0063
Desviación estándar de la ordenada en el origen	0,000876484
Intervalo de confianza de la ordenada en el origen*	(0,0044; 0,0082)
T estadístico de la ordenada en el origen**	7,58079
Valor de la pendiente (b)	0,0527
Desviación estándar de la pendiente	0,00132135
Intervalos de confianza de la pendiente*	(0,0499; 0,0555)
T estadístico de la pendiente**	38,8492

*Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95%.

**Valor de T student para un nivel de significación $P=0,05$ con el grado de libertad $n-1=14$.

✓ pH 4,5

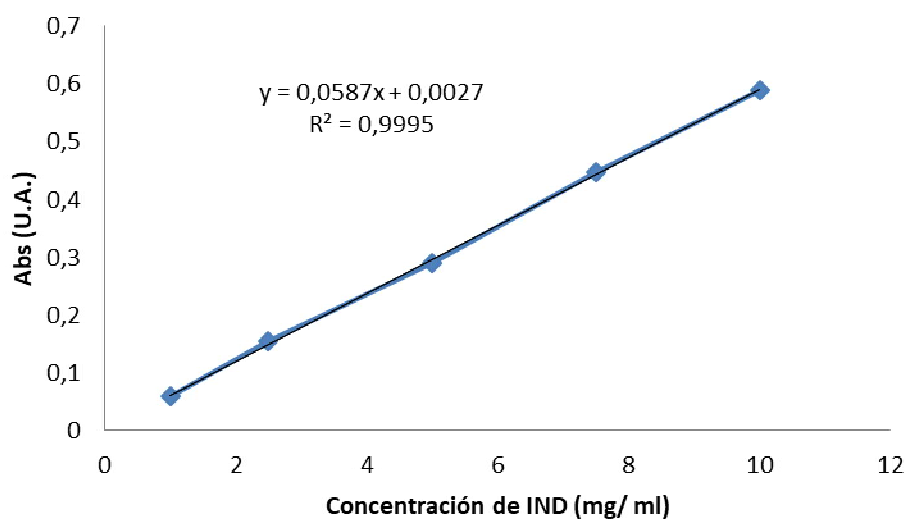


Figura 3.8: Recta de calibrado de IND en pH 4,5.

Longitud de onda: 266 nm.

Concentraciones reales: 1 µg/ ml; 2,5 µg/ ml; 5 µg/ ml; 7,5 µg/ ml y 10 µg/ ml.

Absorbancia (U.A.)= 0,0027 + 0,0587 C

$r = 0,9997$; $r^2 = 0,9995$

Tabla 3.2: Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ a pH 4,5

Parámetro de origen	Valor
Valor de la ordenada en el origen (a)	0,0027
Desviación estándar de la ordenada en el origen	0,00788405
Intervalo de confianza de la ordenada en el origen*	(-0,0169; 0,0196)
T estadístico de la ordenada en el origen**	0,947679
Valor de la pendiente (b)	0,0587
Desviación estándar de la pendiente	0,00128404
Intervalos de confianza de la pendiente*	(0,0559; 0,0615)
T estadístico de la pendiente**	42,2005

*Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95%.

**Valor de T student para un nivel de significación $P=0,05$ con el grado de libertad $n-1=14$.

- pH 6,8

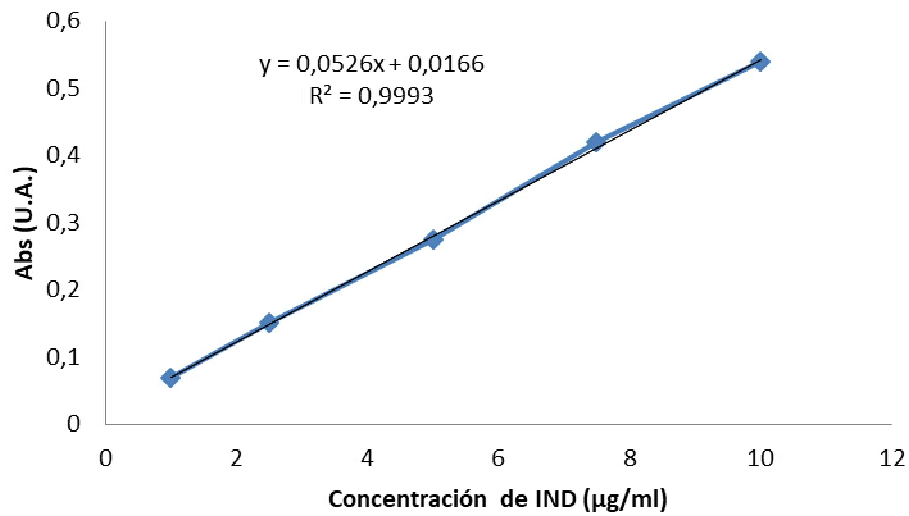


Figura 3.9: Recta de calibrado de IND en pH 6,8.

Longitud de onda: 266 nm.

Concentraciones reales: 1 µg/ ml; 2,5 µg/ ml; 5 µg/ ml; 7,5 µg/ ml y 10 µg/ ml.

Absorbancia (U.A.)= 0,0166 + 0,0526 C

$r = 0,9996$; $r^2 = 0,9993$

Tabla 3.3: Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ a pH 6,8

Parámetro de origen	Valor
Valor de la ordenada en el origen (a)	0,0166
Desviación estándar de la ordenada en el origen	0,00499566
Intervalo de confianza de la ordenada en el origen*	(0,0059; 0,0273)
T estadístico de la ordenada en el origen**	3,62103
Valor de la pendiente (b)	0,0526
Desviación estándar de la pendiente	0,000813622
Intervalos de confianza de la pendiente*	(0,0509; 0,0543)
T estadístico de la pendiente**	64,0324

*Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95%.

**Valor de T student para un nivel de significación $P=0,05$ con el grado de libertad $n-1=14$.

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir que existe una relación directa entre concentraciones y absorbancias dentro del intervalo de concentración utilizado.

3.1.3.1.3. Exactitud

Los resultados de exactitud de nuestro método analítico se muestran en la tabla 3.4 La recuperación de este método presenta valores de C.V. del 0,0634%, 0,0301%, y 4,6500%, a pH 1,2; 4,5 y 6,8, respectivamente, por tanto podemos concluir que no hay retenciones ni pérdidas de la IND y por tanto el método es exacto a estas concentraciones.

Tabla 3.4: Exactitud del método analítico a pH 1,2; 4,5 y 6,8.

pH 1,2						
C teórica (µg/ml)	C exper. 1 (µg/ml)	C exper. 2 (µg/ml)	C exper. 3 (µg/ml)	% recuperado	% recuperado	% recuperado
0,2	0,18406072	0,18406072	0,20303605	92,0303605	92,0303605	101,518027
0,6	0,62049336	0,58254269	0,62049336	103,41556	97,0904491	103,41556
1	1,03795066	0,86717268	1	103,795066	86,7172676	100
pH 4,5						
C teórica (µg/ml)	C exper. 1 (µg/ml)	C exper. 2 (µg/ml)	C exper. 3 (µg/ml)	% recuperado	% recuperado	% recuperado
1	1,01022147	0,99318569	1,01022147	101,022147	99,318569	101,022147
5	4,80919932	4,67291312	4,72402044	96,1839864	93,4582624	94,4804089
10	9,45996593	9,97103918	9,83475298	94,5996593	99,7103918	98,3475298
pH 6,8						
C teórica (µg/ml)	C exper. 1 (µg/ml)	C exper. 2 (µg/ml)	C exper. 3 (µg/ml)	% recuperado	% recuperado	% recuperado
1	0,88212928	0,86311787	0,86311787	88,2129278	86,3117871	86,3117871
5	4,70342205	4,70342205	4,77946768	94,0684411	94,0684411	95,5893536
10	9,51330798	9,5513308	9,72243346	95,1330798	95,513308	97,2243346

3.1.3.1.4. Precisión

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad

En la tabla 3.5 se muestran los resultados del estudio de repetibilidad, en vista de los resultados obtenidos dado que el C.V. es para todos los casos <5%, podemos concluir que el método es repetitivo.

Tabla 3.5: Precisión del método mediante estudios de repetibilidad a pH 1,2; 4,5 y 6,8.

pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
Solución	Abs (U.A.)	Abs (U.A.)	Abs (U.A.)	Abs (U.A.)	Abs (U.A.)
1	0,028	0,265	0,264	0,264	0,264
2	0,028	0,289	0,274	0,274	0,274
3	0,028	0,285	0,275	0,275	0,275
4	0,029	0,257	0,264	0,264	0,264
5	0,028	0,277	0,284	0,284	0,284
6	0,029	0,28	0,284	0,284	0,284
C.V.	1,82%	4,44%	3,27%	3,27%	3,27%

Precisión intermedia

Los resultados de precisión intermedia para este método analítico se pueden observar en la tabla 3.6 al presentar la precisión intermedia un C.V. menor del 5% se puede considerar este método como preciso.

Tabla 3.6: Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia a pH 1,2; 4,5 y 6,8.

Días	Operador	Soluciones	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
			Absorbancias	C.V.	Absorbancias	C.V.	Absorbancias	C.V.
Primer día	1	1	0,028	1,82%	0,264	4,44%	0,265	3,27%
		2	0,028		0,274		0,289	
		3	0,028		0,275		0,285	
		4	0,029		0,264		0,257	
		5	0,028		0,284		0,277	
		6	0,029		0,284		0,28	
Segundo día	2	1	0,027	2,67%	0,29	0,90%	0,274	2,44%
		2	0,029		0,291		0,281	
		3	0,029		0,285		0,265	
		4	0,028		0,289		0,268	
		5	0,028		0,292		0,277	
		6	0,028		0,287		0,281	

3.1.3.1.5. Sensibilidad

La sensibilidad se demuestra en los límites de detección y de cuantificación. La Conferencia Internacional de Harmonización (ICH, 2005) ofrece tres posibilidades para el cálculo de los límites de detección y de cuantificación: una primera visual, una segunda basada en la relación entre señal y ruido y una tercera posibilidad que es la aplicación de un método matemático. De todos ellos se optó por el método más riguroso, que es el método matemático.

Para calcular los límites de detección y cuantificación por este método es necesario conocer la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de calibración obtenida por el método de los mínimos cuadrados. Como desviación estándar de la respuesta se tomó la desviación estándar del blanco.

Se analizaron 10 muestras distintas de blanco cuyas absorbancias se muestran en la tabla 3.7.

Tabla 3.7: Absorbancias de 10 blancos.

Muestra	Absorbancia a pH 1,2	Absorbancia a pH 4,5	Absorbancia a pH 6,8
Blanco 1	0,0003	0,0002	0,0002
Blanco 2	0,0004	0,0001	0,0001
Blanco 3	0,0002	0,0001	0,0002
Blanco 4	0,0002	0,0001	0,0002
Blanco 5	0,0001	0,0002	0,0002
Blanco 6	0,0002	0,0002	0,0002
Blanco 7	0,0002	0,0002	0,0001
Blanco 8	0,0001	0,0002	0,0002
Blanco 9	0,0002	0,0001	0,0001
Blanco 10	0,0003	0,0001	0,0002
Media	0,0003	0,00013333	0,00016667
Desviación estándar	9,57427 x10-05	0,00005	0,00005

El límite de cuantificación (L.C.) para una recta $y = y_0 + 10S_b$ es:

$$L.C. = \frac{y + K S_b}{b}$$

Donde y es la media de las respuestas para 10 blancos, K es una constante que para el límite de cuantificación es 10 y S_b es la desviación estándar de los 10 blancos y b es la pendiente.

Por tanto para nuestro método analítico el límite de cuantificación será:

✓ pH 1,2

$$L.C. = \frac{0,0003 + 10 \times 9,57 \cdot 10^5}{0,0527} = 0,0239 \mu\text{g/ml.}$$

✓ pH 4,5

$$L.C. = \frac{0,00013333 + 10 \times 0,00005}{0,0587} = 0,0108 \mu\text{g/ml.}$$

✓ pH 6,8

$$L.C. = \frac{0,00016667 + 10 \times 0,00005}{0,0526} = 0,0127 \mu\text{g/ml.}$$

El límite de detección (L.D.) para una recta $y = y_0 + K S_b$ es:

$$L.D. = \frac{y + K S_b}{b}$$

Donde y es la media de las respuestas para 10 blancos, K es una constante que para el límite de detección es 3,3 y S_b es la desviación estándar de los 10 blancos y b es la pendiente.

Por tanto para nuestro método analítico el límite de detección será:

✓ pH 1,2

$$L.D. = \frac{0,0003 + 3,3 \times 9,57 \cdot 10^5}{0,0527} = 0,0117 \mu\text{g/ml.}$$

✓ pH 4,5

$$L.D. = \frac{0,00013333 + 3,3 \times 0,00005}{0,0587} = 0,0051 \mu\text{g/ml.}$$

✓ pH 6,8

$$L.D. = \frac{0,00016667 + 3,3 \times 0,00005}{0,0526} = 0,0063 \mu\text{g/ml.}$$

3.1.3.2. Espectrofotómetro UV-VIS Jasco® V-730.

3.1.3.2.1. Especificidad

En la figura 3.10 se pueden observar los espectros de barrido de un gel de IND DS DS-1:0,12:5-NaOH, un gel de la formulación DS-0:0,12:5-NaOH y otro gel de DS-0:0,12:0-NaOH, todos ellos formulados a pH 4,5. Las absorbancias medidas a 266 nm fueron de 0,0897, 0,0015 y 0,0005, respectivamente.

En vista de estos resultados, podemos concluir que, debido a los valores de absorbancia que presenta el gel de la formulación DS-0:0,12:5-NaOH y el gel de DS-0:0,12:0-NaOH, a 266 nm, donde la IND muestra su máximo de absorción, no se produce ninguna interferencia y por tanto, se puede afirmar que el método espectrofotométrico propuesto es específico para la determinación de IND a longitud de onda de 266 nm.

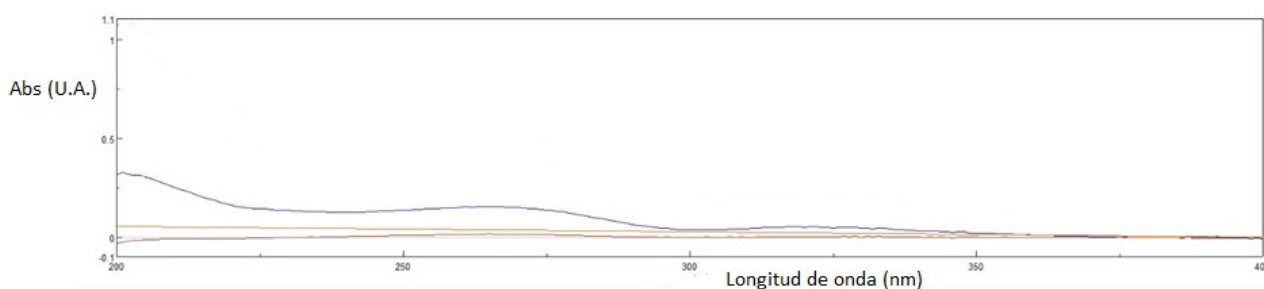


Figura 3.10: Espectro de barrido gel de DS-1:0,12:5-NaOH (5 $\mu\text{g/ml}$) (—); gel de DS-0:0,12:5-NaOH (—) y gel de DS-0:0,12:0-NaOH (—).

3.1.3.2.2. Linealidad

Se determina la linealidad para pH 4,5. A partir de una solución madre se realizan 5 diluciones de concentración distinta y se comprueba la linealidad. Los resultados se muestran en la tabla 3.8 y la recta de calibrado es:

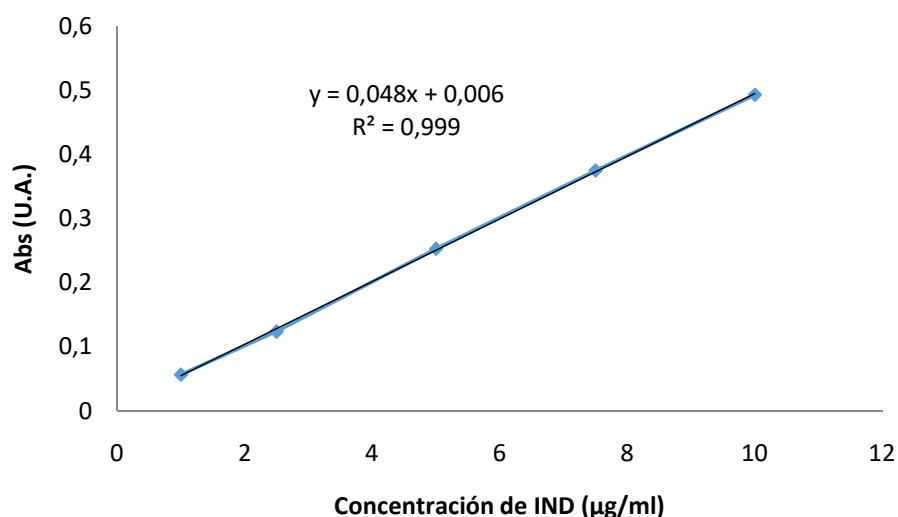


Figura 3.11: Recta de calibrado de IND en pH 4,5 espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.

- Longitud de onda: 266 nm.
- Concentraciones reales: 0,2 µg/ ml; 0,4 µg/ ml; 0,6 µg/ ml; 0,8 µg/ ml y 1 µg/ ml.
- Absorbancia (U.A.)= 0,0489 + 0,0066C
- $r = 0,9998$; $r^2 = 0,9997$

Tabla 3.8: Parámetros correspondientes al análisis de regresión lineal $y=a+bx$ a pH 4,5 espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.

Parámetro	Valor
Valor de la ordenada en el origen (a)	0,0489
Desviación estándar de la ordenada en el origen	0,0144641
Intervalo de confianza de la ordenada en el origen*	(0,0179; 0,0634)
T estadístico de la ordenada en el origen**	0,156233
Valor de la pendiente (b)	0,0066
Desviación estándar de la pendiente	0,0023557
Intervalos de confianza de la pendiente*	(0,0015; 0,0117)
T estadístico de la pendiente**	21,704

*Se calcula el intervalo de confianza para un índice de confianza del 95%.

**Valor de T student para un nivel de significación $P=0,05$ con el grado de libertad $n-1=14$.

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir que existe una relación directa entre concentraciones y absorbancias dentro del intervalo de concentración utilizado.

3.1.3.2.3. Exactitud

Los resultados de exactitud de nuestro método analítico se muestran en la tabla 3.9.

La recuperación de este método presenta valores de C.V. del 0,0751%, por tanto podemos concluir que no hay retenciones ni pérdidas de IND, y por tanto el método es exacto a estas concentraciones.

Tabla 3.9: exactitud del método analítico a pH 4,5 espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.

C teórica (µg/ml)	C exper. 1 (µg/ml)	C exper. 2 (µg/ml)	C exper. 3 (µg/ml)	% recuperado	% recuperado	% recuperado
1	0,89366053	1,03476483	0,87116564	89,3660532	103,476483	87,1165644
5	4,43149284	4,4396728	5,23312883	88,6298569	88,793456	104,662577
10	9,46523517	9,41308793	10,3190184	94,6523517	94,1308793	103,190184

3.1.3.2.4. Precisión

La precisión se va a calcular a partir de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad

En la tabla 3.10 se muestran los resultados del estudio de repetibilidad, en vista de los resultados obtenidos dado que el C.V. es para todos los casos $<5\%$, podemos concluir que el método es repetitivo.

Tabla 3.10: Precisión del método mediante estudios de repetibilidad a pH 4,5 en el espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.

Solución	Abs (U.A.)
1	0,2229
2	0,2237
3	0,2704
4	0,2751
5	0,2625
6	0,2651
C.V.	0,0933%

Precisión intermedia

Los resultados de precisión intermedia para este método analítico se pueden observar en la tabla 3.11 al presentar la precisión intermedia un C.V. menor del 5% se puede considerar este método como preciso.

Tabla 3.11: Precisión del método mediante estudios de precisión intermedia a pH 4,5 espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-730.

Días	Operador	Soluciones	Absorbancias	C.V.
1º	1	1	0,2229	0,0933%
		2	0,2237	
		3	0,2704	
		4	0,2751	
		5	0,2625	
		6	0,2651	
2º	2	1	0,027	0,0944%
		2	0,029	
		3	0,029	
		4	0,028	
		5	0,028	
		6	0,028	

3.1.3.2.5. Sensibilidad

Para calcular los límites de detección y cuantificación por el método matemático es necesario conocer la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de calibración obtenida por el método de los mínimos cuadrados. Como desviación estándar de la respuesta se tomó la desviación estándar del blanco.

Se analizaron 10 muestras distintas de blanco cuyas absorbancias se muestran en la tabla 3.12.

Tabla 3.12: absorbancias de 10 blancos.

Muestra	Absorbancia
Blanco 1	0,0002
Blanco 2	0,0003
Blanco 3	0,0001
Blanco 4	0,0001
Blanco 5	0,0001
Blanco 6	0,0002
Blanco 7	0,0002
Blanco 8	0,0002
Blanco 9	0,0002
Blanco 10	0,0003
Media	0,0002
Desviación estándar	$9,5743 \times 10^{-5}$

El límite de cuantificación (L.C.) para una recta $y = y_0 + 10S_b$ es:

$$L.C. = \frac{y + K S_b}{b}$$

Donde y es la media de las respuestas para 10 blancos, K es una constante que para el límite de cuantificación es 10 y S_b es la desviación estándar de los 10 blancos y b es la pendiente.

Por tanto para nuestro método analítico el límite de cuantificación será:

$$L.C. = \frac{0,0002 + 10 \times 9,57 \cdot 10^{-5}}{0,0489} = 0,0237 \mu\text{g/ml}.$$

El límite de detección (L.D.) para una recta $y = y_0 + K S_b$ es:

$$L.D. = \frac{y + K S_b}{b}$$

Donde y es la media de las respuestas para 10 blancos, K es una constante que para el límite de detección es 3,3 y S_b es la desviación estándar de los 10 blancos y b es la pendiente.

Por tanto para nuestro método analítico el límite de detección será:

$$L.D. = \frac{0,000 \quad 3,3 \times 9,57 \cdot 10^5}{0,0489} = 0,0105 \mu\text{g/ml}.$$

3.2. MÉTODOS CUALITATIVOS

3.2.1. Ángulo de contacto

3.2.1.1. Introducción

La afinidad líquido-sólido se rige por el ángulo de contacto, que se define como el ángulo geométrico entre la interfaz líquido-líquido y la superficie sólida en el punto donde se encuentran las tres fases. El ángulo se mide desde la superficie hasta el lado líquido de la interfaz. Un menisco líquido moja una superficie si el ángulo de contacto es menor de 90° y no humedece la superficie cuando los ángulos son más altos de 90° (Montes Ruiz-Cabello, 2009).

El valor del ángulo de contacto depende de los requisitos específicos de la interfaz del sistema trifásico. La primera descripción de esta dependencia fue hecha por Thomas Young al comienzo del siglo XIX. Esta descripción, que se conoce como la ecuación de Young, se desarrolló para describir la interacción entre una superficie sólida líquida e ideal.

Una superficie sólida ideal es químicamente homogénea, no porosa, rígida, perfectamente lisa e inerte. En tales superficies, las gotas de líquido exhiben el mismo ángulo de contacto alrededor de la línea de contacto.

Las superficies reales son, al menos, rugosas y químicamente heterogéneas en diferentes grados y escalas. Además, muchas superficies reales son porosas, reactivas e incluso deformables. Estas propiedades son fuentes de incertidumbre y variabilidad del ángulo de contacto durante la dispersión del

líquido. En tales superficies, se cuestiona la validez de la ecuación de Young. Necesitamos definir el ángulo de contacto observable (OCA) que se define como el ángulo de contacto accesible experimentalmente (Montes Ruiz-Cabello, 2009).

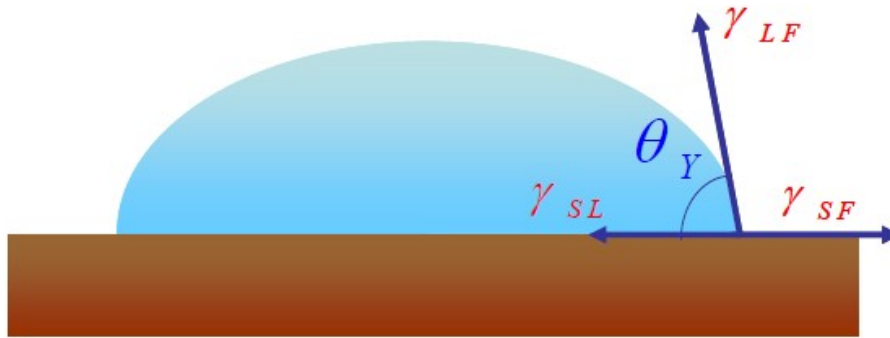


Figura 3.12: Ángulo de contacto y tensiones interfaciales. (Montes, 2009).

Donde γ_{SL} , γ_{LF} y γ_{SF} son las tensiones interfaciales sólido-líquido, líquido-fluido y sólido-fluido respectivamente y θ_Y es el ángulo de Young.

Principalmente, existen dos enfoques diferentes para medir el ángulo de contacto: técnicas goniométricas (Sessile Drop, SD y Captive Bubble, CB) y técnicas tesométricas.

Las técnicas goniométricas se basan en la forma de caída / burbuja de uno o más perfiles de la interfaz líquido-fluido.

Por otro lado, las técnicas tesométricas obtienen el ángulo de contacto indirectamente a partir de la medición de la fuerza en la superficie sólida durante su inmersión o extracción del líquido.

Ambas técnicas proporcionan un ángulo de contacto macroscópico (Montes Ruiz-Cabello, 2009).

3.2.1.2. Materiales y Métodos

Las mediciones del ángulo de contacto en las muestras pulverulentas compactadas se realizaron en un sistema de ángulo de contacto Dataphysics OCA equipado con un goniómetro convencional y una cámara de video de alto

rendimiento controlada por el software OCA20 proporcionado por el fabricante (Figura 3.13).

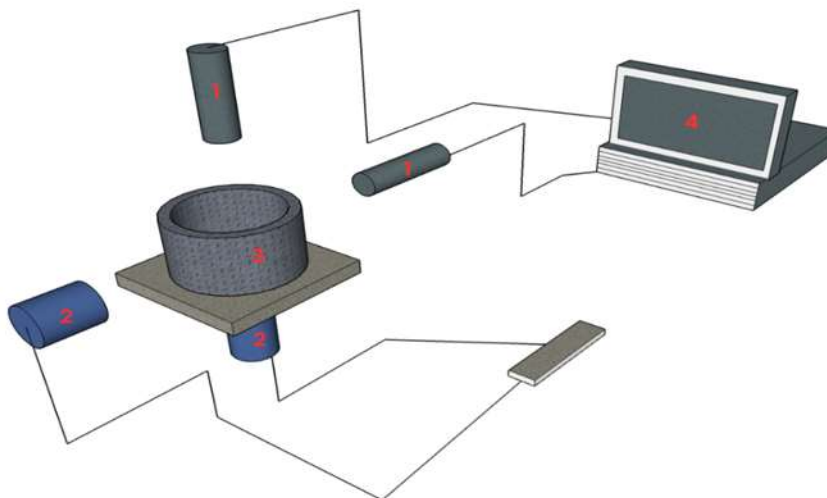


Figura 3.13: Configuración experimental para la medición del ángulo de contacto. Cámara de 1 CCD, 2 fuentes de luz, 3 cámara de medición, 4 ordenador.

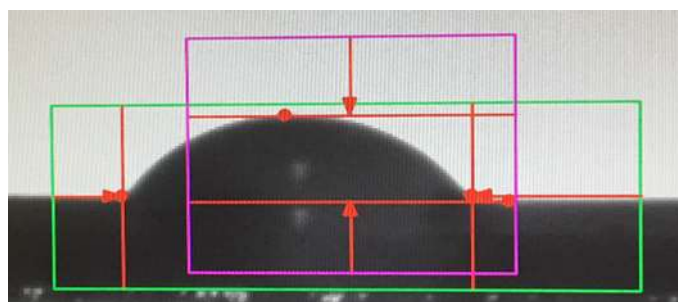


Figura 3.14: Técnica de análisis de forma de caída axisimétrica (ADSA-P) utilizada para el análisis de imágenes.

Se utilizó una jeringa conectada a un capilar de teflón con un diámetro interno de aproximadamente 2 mm para suministrar líquido desde arriba para medir las gotas. Se pesaron y comprimieron 200 mg de cada muestra usando un punzón y conjunto de troquel de acero inoxidable circular (diámetro 1 cm) en una prensa hidráulica manual para pastillas de infrarrojos (tiempo de permanencia durante 30 s y una presión de 8 toneladas).

Se colocó una gota de agua desionizada (2,5 μ l) en la placa comprimida y la medición del ángulo de contacto se inició en modo dinámico. La cámara captura imágenes de 640 x 480 píxeles a una velocidad máxima de 60 imágenes por segundo.

Las imágenes se analizan utilizando el perfil de análisis de forma de caída axisimétrico (ADSA-P) para obtener la longitud de contacto y la altura de la

gota como se muestra en la figura 3.14. Finalmente, estos parámetros se utilizan para estimar el ángulo de contacto de la gota. Se realizaron tres mediciones por muestra para asegurar la reproducibilidad. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

3.2.2. Estudios de velocidad de disolución de las diferentes formulaciones del IND.

3.2.2.1. Introducción

Para que los fármacos puedan absorberse es preciso que se encuentren en solución en las proximidades del lugar de absorción. Si la velocidad de disolución es inferior a la de absorción, la disolución resulta un paso crítico que puede comprometer seriamente la biodisponibilidad del fármaco.

Los ensayos de disolución *in vitro* se utilizan en el desarrollo de nuevos medicamentos como indicativo del comportamiento de la forma farmacéutica *in vivo*, es decir del proceso de disolución en los fluidos gastrointestinales.

Permiten obtener información sobre las características del principio activo y también del proceso de fabricación.

Por todo lo anterior, en el desarrollo de nuevos medicamentos es fundamental llevar a cabo estos estudios.

3.2.2.2. Materiales y Métodos

Formulaciones destinadas a la administración oral

Materiales

Se ha agrupado el material en: materias primas, reactivos, soluciones e instrumental.

Materias primas

- IND. Fagron Iberica[®] SAU, España.
- Lauril sulfato sódico (LSS). Fischer Scientific[®], Inglaterra.
- L-HPC. Shin-Etsu[®], Tokio, Japón.

Reactivos

- Ácido acético glacial. Calidad PRS- Codex (Panreac Química[®] S.A., Barcelona).
- Acetato sódico PRS (Panreac Química[®] S.A., Barcelona).
- Dihidrógeno fosfato de potasio PRS (Panreac Química[®] S.A., Barcelona).
- Hidróxido sódico PRS (Panreac Química[®] S.A., Barcelona).

Soluciones

- Agua desionizada obtenida por un sistema Milli-Q[®] (Millipore[®], Estados Unidos).

- Disolución ácido clorhídrico 0,1 N (pH 1,2) según la USP 42: se añaden 8,3 ml de una disolución de ácido clorhídrico al 37% en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Disolución normalizada de ácido acético 2 N según la USP 42: se añaden 116 ml de ácido acético glacial en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 4,5 según la USP 42: se añaden 2,99 g de acetato sódico trihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en un matraz aforado de 1000 ml y se añaden 14 ml de ácido acético 2N y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 6,8 según la USP 42: se añaden 50 ml de una disolución de fosfato potásico monobásico 0,2 M y 22,4 ml de una disolución de hidróxido sódico 0,2 M en un matraz aforado de 200 ml y se enrasa con agua destilada.
- Solución de NaOH 0,2 M.

Instrumental

- Aparato de velocidad de disolución (paletas) DT80 (Erweka[®] GMBH, Germany).
- Espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan).

Métodos

Se realizan ensayos de velocidad de disolución de las siguientes formulaciones de IND: IND materia prima, DS-1:0,06:0; DS-1:0,12:0; DS-1:0,12:5; DS-1:0,12:10; DS-1:0,12:20; MF-1:0,12:20; DS-1:0,12:0-NaOH; DS-1:0,12:5-NaOH; DS-1:0,12:20-NaOH; MF-1:0,12:20-NaOH.

Inicialmente, se estudió la velocidad de disolución de las diferentes formulaciones en fluido gástrico simulado sin enzimas (0,1 N HCl). Sin embargo, los resultados de velocidad de disolución mostraron una baja disolución del fármaco (menos del 12,7%). Asimismo, otros autores han reportado que a pH 1,2 se disolvió menos del 6,2% de IND.

Debido a esto, y que otros autores han obtenido resultados satisfactorios a un pH similar (El-Badry, et al., 2009), se pensó en utilizar el tampón fosfato a pH 6,8 como medio de disolución en nuestro método.

Sin embargo, a este pH (6,8) se produce una disolución tan rápida del fármaco que es imposible observar diferencias entre los perfiles de disolución de las

diferentes DS. Por lo tanto, con el objetivo de obtener perfiles de disolución más lentos que permitan observar diferencias en las tasas de disolución entre las diferentes formulaciones, los ensayos de disolución también se realizaron a pH 4,5.

Condiciones de los ensayos de velocidad de disolución:

1. Aparato: aparato 2 según USP (paletas).
2. Velocidad de rotación: 50 rpm.
3. Volumen del medio de disolución: 900 ml.
4. Temperatura: $37,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.
5. Cantidad de muestra por vaso: el equivalente a 10 mg de IND.
6. Tiempos de muestreo: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 24 horas.
7. Volumen de muestra: 5 ml y se filtró a través de un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ (Minisart®).
8. Cuantificación de la cantidad de IND disuelta: por espectrofotometría UV-VIS a 262 nm para los ensayos realizados a pH 1,2 y a 266 nm para los realizados en pH 4,5 y 6,8.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la diferencia estadística mínima de Fisher (LSD) para comparaciones múltiples. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Formulaciones destinadas a la administración tópica

Materiales

Se ha agrupado el material en: materias primas, reactivos, soluciones e instrumental.

Materias primas

- IND. Fagron Iberica® SAU, España.
- LSS. Fischer Scientific®, Inglaterra.

- L-HPC. Shin-Etsu[®], Tokio, Japón.

Reactivos

- Ácido acético glacial. Calidad PRS- Codex. Panreac Química[®] S.A., España.
- Acetato sódico PRS. Panreac Química[®] S.A., España.

Soluciones

- Agua desionizada obtenida por un sistema Milli-Q[®]. Millipore[®], Estados Unidos.
- Disolución normalizada de ácido acético 2 N según la USP 42: se añaden 116 ml de ácido acético glacial en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 4,5 según la USP 42: se añaden 2,99 g de acetato sódico trihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en un matraz aforado de 1000 ml y añaden 14 ml de ácido acético 2N y se enrasa con agua destilada.

Instrumental

- Aparato de velocidad de disolución DT80 (Erweka[®] GMBH, Germany).
- Espectrofotómetro UV-VIS Jasco[®] V-730. (Jasco[®], Japón).

Métodos

Según los resultados de los ensayos de velocidad de disolución de distintas formulaciones de IND, llevados a cabo anteriormente, el fluido gástrico simulado sin enzimas (0,1 N HCl), no es un medio de disolución útil para comparar perfiles de velocidad de disolución de formulaciones de IND debido a la baja disolución del fármaco (inferior al 12,7%).

Por otra parte, se descartó realizar los estudios de velocidad de disolución a pH 6,8, ya que se produce una disolución tan rápida del fármaco que es imposible observar diferencias entre los perfiles de disolución de las diferentes DS.

Consecuentemente, con el objetivo de obtener perfiles de disolución más lentos que permitan comparar los diferentes perfiles de disolución de los geles de IND, los ensayos de disolución se realizaron a pH 4,5.

Para realizar el ensayo de disolución de los geles de IND se utilizó el método de la célula, descrito en la Real Farmacopea Española 5ª edición.

Condiciones de los ensayos de velocidad de disolución: (RFE, 2015).

1.- Aparato: aparato de paletas y célula de extracción (célula).

La célula está hecha de un material químicamente inerte y se compone de un soporte, una tapa y, de una membrana situada sobre el gel a examinar, para aislarlo del medio cuando éste pueda modificar o alterar las propiedades fisicoquímicas del mismo (Figura 3.15 y Figura 3.16).

El soporte de la célula tiene en su parte central una cavidad destinada a contener el gel. Esta cavidad tiene una profundidad de 2,6 mm y un diámetro adaptado al tamaño del parche a examinar. Se pueden utilizar los siguientes diámetros: 27 mm, 38 mm, 45 mm, 52 mm, que corresponden a volúmenes de 1,48 ml, 2,94 ml, 4,13 ml, 5,52 ml, respectivamente. Nosotros hemos usado un diámetro de 45 mm.

La tapa tiene una abertura central con diferentes diámetros: 20 mm, 32 mm, 40 mm, 50 mm que corresponden a una superficie de 3,14 cm², 8,03 cm², 12,56 cm², 19,63 cm², respectivamente. Nosotros hemos usado un diámetro de 45 mm. La tapa se mantiene en posición mediante tuercas roscadas a pernos que sobresalen del soporte. La estanqueidad entre la tapa y el soporte se asegura mediante una junta de caucho sujeta al soporte.

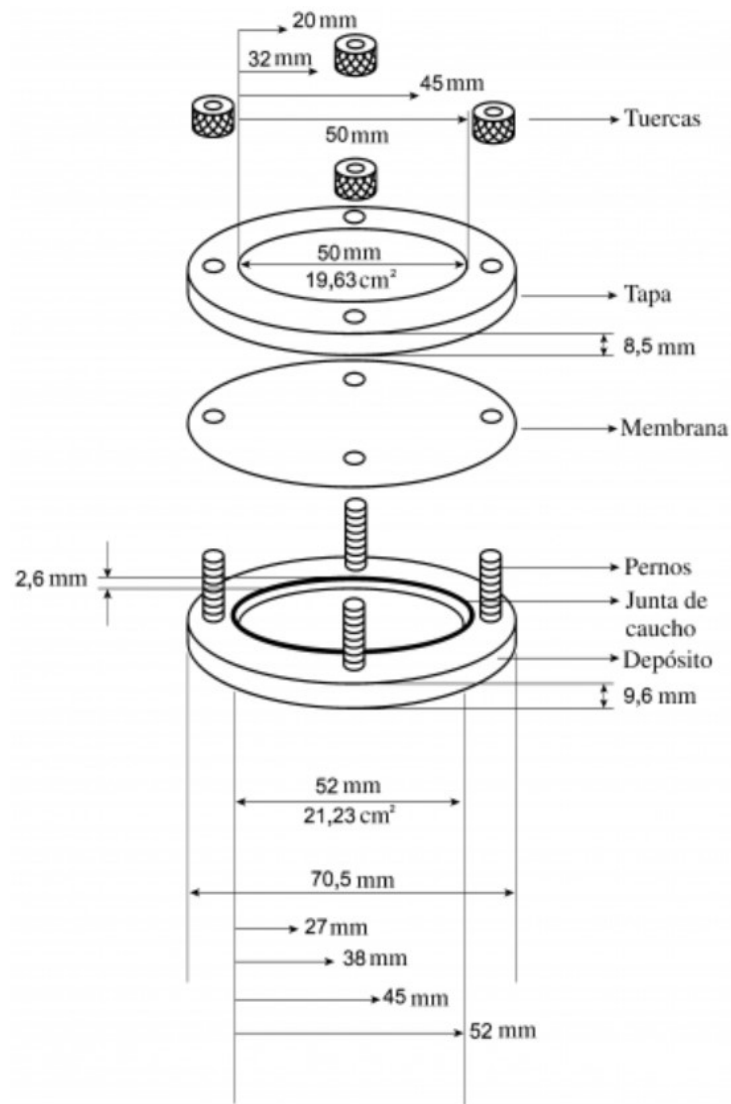


Figura 3.15: Dimensiones de la célula de extracción. (AEMPS, 2015).



Figura 3.16: Célula de extracción.

La célula mantiene el gel a examinar en posición horizontal, con la superficie de liberación hacia arriba y paralelo al borde inferior de la paleta. Se mantiene una

distancia de 25 ± 2 mm entre el borde inferior de la paleta y la superficie del gel.

2. Velocidad de rotación: 50 rpm.

3. Volumen del medio de disolución: 450 ml.

4. Temperatura: $32,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

5. Cantidad de muestra por vaso: el equivalente a 5 mg de IND.

6. Tiempos de muestreo: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 24 horas.

7. Volumen de muestra: 5 ml y se filtró a través de un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ (Minisart®).

8. Cuantificación de la cantidad de IND disuelta: por espectrofotometría UV-VIS a 266 nm. Esta cuantificación se realizó utilizando la recta de calibrado que se muestra en la validación del método espectrofotométrico para el espectrofotómetro UV-VIS Jasco V730. Jasco®, Japón.

Procedimiento:

Añadir 450 ml de medio de disolución y estabilizar el medio a la temperatura especificada. Colocar el gel en la célula. Cerrar la célula.

Introducir la célula horizontalmente en el fondo del vaso, con la tapa hacia arriba. Inmediatamente hacer girar la paleta, a 50 rpm.

A los tiempos indicados, extraer una muestra de la zona situada a media distancia entre la superficie del medio de disolución y el borde superior de la pala y a no menos de 1 cm de la pared del vaso.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

3.2.3. SEM.

3.2.3.1. Introducción

La microscopía electrónica de barrido (SEM, debido a Scanning Electron Microscope) es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Para formar una imagen utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz.

Las imágenes se pueden obtener con electrones secundarios y retrodispersados, estas últimas nos dan información de variaciones composicionales de la muestra, mientras que las primeras permiten observar la textura y características morfológicas de las fases analizadas.

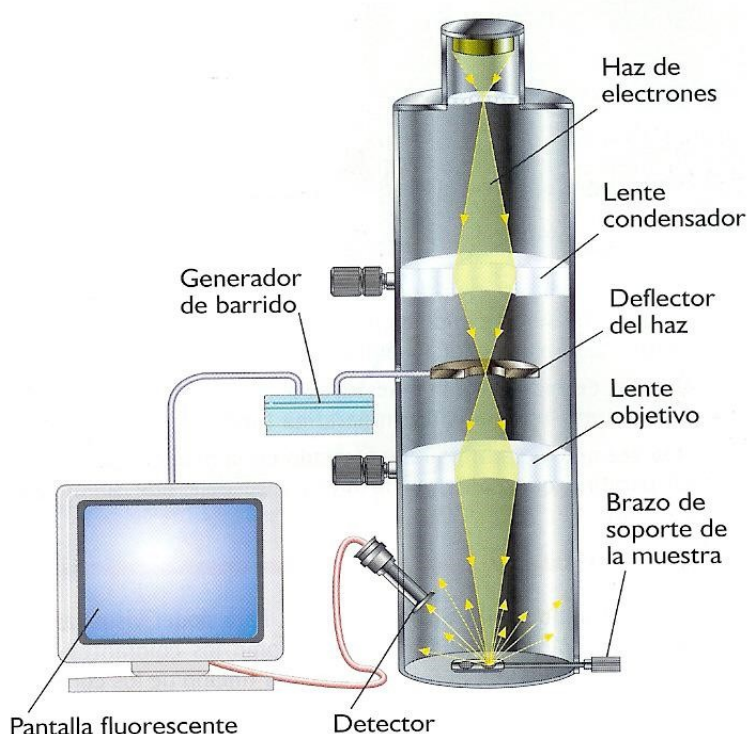


Figura 3.17: Esquema de un microscopio electrónico de barrido. (EcuRed, 2018).

3.2.3.2. Materiales y métodos

Las muestras correspondientes (IND materia prima, DS-0:0,12:0, DS-1:0,12:0, DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10, DS-1:0,12:20, DS-1:0,12:0-NaOH; DS-1:0,12:5-NaOH y DS-1:0,12:20-NaOH, MF-1:0,12:20, MF-1: 0,12: 20-NaOH y L-HPC), se colocaron en un soporte de aluminio.

Después de recubrir con una capa delgada de oro-paladio, las muestras se analizaron con un microscopio electrónico de barrido Jeol® 6400 JSM.

Todas las micrografías fueron el producto de imágenes electrónicas secundarias utilizadas para la caracterización morfológica de la superficie.

Las fotografías se tomaron a 500 aumentos y con un voltaje de aceleración de 20 kV.

3.2.4. Difracción de Rayos X.

3.2.4.1. Introducción

La difracción de rayos X (XRPD) es una técnica no destructiva para caracterizar materiales cristalinos que proporciona información sobre estructuras, fases, orientaciones de cristal (textura) que predominan y otros parámetros estructurales, como el tamaño de grano promedio, la cristalinidad, la deformación y los defectos de los cristales.

Los picos de XRPD se producen por la interferencia constructiva de un haz monocromático de rayos X dispersos en ángulos específicos de cada conjunto de planos de celosía en una muestra.

Las intensidades de los picos están determinadas por las posiciones atómicas dentro de los planos de la red. En consecuencia, el patrón de XRPD es la huella digital de la estructura atómica de un determinado material.

Esta técnica es especialmente útil para la diferenciación entre las formas amorfas y las cristalinas, y así como pequeñas modificaciones en la estructura cristalina.

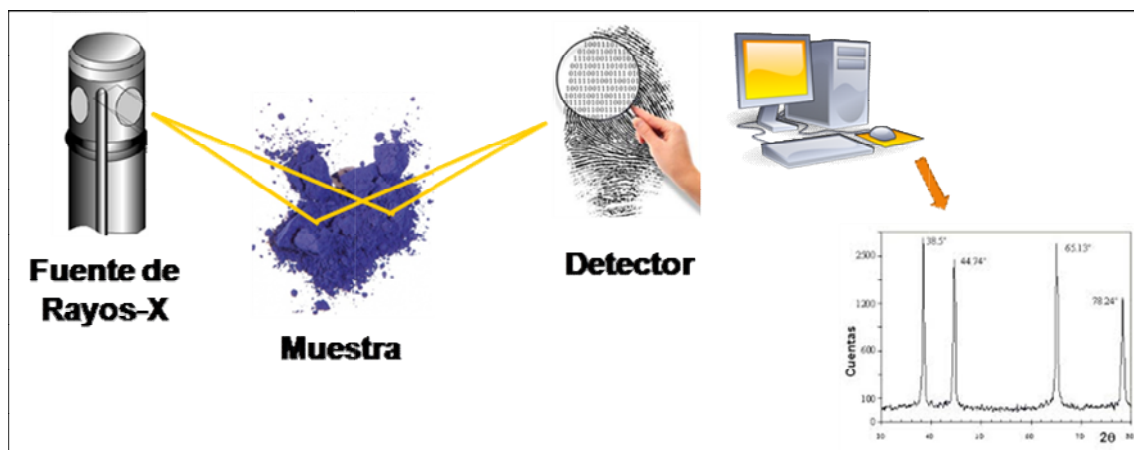


Figura 3.18: Difracción de rayos X. (Universidad de Málaga, 2006).

3.2.4.2. Materiales y métodos

Se llevó a cabo la caracterización por XRPD sobre varias muestras (IND materia prima, DS-1:0,12:0, DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10, DS-1:0,12:20, MF-1:0,12:5; MF-1:0,12:20, DS-1:0,12:0-NaOH, DS-1:0,12:5-NaOH, DS-1:0,12:20-NaOH, MF-1:0,12:5-NaOH; MF-1:0,12:20-NaOH y L-HPC) en estudio a temperatura ambiente.

Se empleó el método de polvo y barrido de superficie. Se dispersaron aproximadamente 20 mg de muestra sobre un soporte de Si, tomando la precaución de no introducir una orientación preferencial de los cristales, y se introdujeron las muestras en un equipo Philips XPERT®.

Cada muestra fue expuesta a una radiación Cu- α siendo los ángulos de incidencia desde 5° hasta 35° con un intervalo de 2θ y con una velocidad de ángulo de 0,04 (2θ).

3.2.5. DSC

3.2.5.1 Introducción

La DSC es, según el comité de nomenclatura ICTA1, una técnica en la cual se monitoriza el flujo de calor sobre la muestra frente al tiempo o la temperatura.

Esto, permite, desde un punto de vista termoanalítico, la caracterización de diversas sustancias, la determinación de la pureza de productos sólidos y de factores que afectan a su estabilidad (Groenewoud, 2001).

En nuestro caso, evaluaremos las posibles modificaciones en la estructura cristalina de las formulaciones, cambios que de producirse influirían en la solubilidad de la IND, aumentando ésta con la presencia de formas amorfas y disminuyendo a medida que se incrementa la cristalinidad.



Figura 3.19: Calorímetro diferencial de barrido. (Mettler Toledo, 2018).

3.2.5.2. Materiales y métodos

El análisis DSC se utilizó para caracterizar el comportamiento térmico de la IND; DS-1:0,12:0, DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10, DS-1:0,12:20, MF-1:0,12:20, DS-1:0,12:0-NaOH, DS-1:0,12:5-NaOH, DS-1:0,12:20-NaOH, MF-1:0,12:20-NaOH y L-HPC. Los termogramas DSC se obtuvieron utilizando un analizador térmico automático (Mettler Toledo TC15, controlador TA).

Las muestras de aproximadamente 2 mg se pesaron con precisión en bandejas de aluminio, luego se cerraron herméticamente con tapas de aluminio y se sometieron a una temperatura de entre 30°C a 220°C a una velocidad de calentamiento de 10°C / min bajo una purga constante de nitrógeno seco 20 ml / min. Se usó una bandeja vacía, sellada de la misma manera que la muestra, como referencia.

3.2.6. Estudio farmacocinético tras administración oral de las formulaciones seleccionadas

3.2.6.1. Introducción

Los estudios farmacocinéticos permiten conocer la evolución de las concentraciones de los fármacos en el interior del organismo a lo largo del tiempo.

Se realizó un estudio comparativo del comportamiento farmacocinético de las formulaciones seleccionadas tras la administración oral de una dosis única de IND, en animales de experimentación (ratas).

Los estudios se realizaron en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá, que cumple con los requerimientos legislativos relativos a las experimentaciones en animales.

Todos los estudios que se realizaron en este proyecto están de acuerdo con la directiva europea 86/609/CEE del 24 de noviembre de 1986, para la armonización de las leyes y procedimientos administrativos relacionadas con la protección de los animales destinados a la experimentación u otros fines científicos).

El uso de animales está plenamente justificado: en la búsqueda bibliográfica (PubMed y ScienceDirect) no se han encontrado métodos alternativos *in vitro* para relacionar la farmacocinética y la seguridad de estos tratamientos a 10 de julio de 2019. Sin embargo, existen una gran cantidad de artículos que emplean como modelo experimental a ratas para comparar los perfiles farmacocinéticos de distintas formulaciones de antiinflamatorios.

Se han tenido en cuenta todas las posibilidades de: Reducción, Refinamiento y Reemplazo

Se han puesto todos los medios para asegurar el bienestar animal.

3.2.6.2. Materiales y métodos

Materiales

Se ha agrupado el material en: materias primas, soluciones e instrumental.

Materias primas

- Formulaciones: Las formulaciones empleadas para este estudio fueron IND materia prima y DS-1:0,12:5-NaOH.
- Animales de experimentación: Se emplearon como animales de experimentación, ratas Wistar macho, de un peso aproximadamente de 300 gramos. Para las muestras plasmáticas de cada tiempo de análisis se utilizaron 6 ratas.

Soluciones

Las distintas formulaciones patrón de IND disuelta en la fase móvil de limpieza, se utilizaron para elaborar la recta de calibración del método.

Instrumental

El equipo de HPLC utilizado fue el sistema modular Jasco® (Japón) con las siguientes condiciones cromatográficas:

- Columna: Mediterranea 18 Teknokroma, 5 µm de diámetro interno y de 25 x 0,46 cm.
- Fase móvil: ácido acético al 2,5%: acetonitrilo (35:65) (v/v).
- Temperatura columna: ambiente (aproximadamente 25°C).
- Flujo de la fase móvil: 1 ml/min.
- Volumen de inyección: 50 µl.
- Longitud de onda empleada en el detector: 266 nm.
- Tiempo de análisis: 10 min.
- Fase móvil de lavado: agua purificada: acetonitrilo (35:65) (v/v).

Para filtrar la fase móvil y la fase de lavado empleadas en el equipo de HPLC se utiliza un filtro Millipore® de 0,45 µm conectado a una bomba de vacío y para desgasificar dichas fases se utiliza un desgasificador de ultrasonidos.

Para el tratamiento de las muestras se utiliza una centrífuga Universal 32 Hettich Zentrifugen®.

Para el análisis de las concentraciones alcanzadas a los diferentes tiempos tras la administración única de una dosis de IND de 5 mg/kg se utilizó la técnica de HPLC para las dos formulaciones empleadas.

Métodos

Puesta a punto del método analítico por HPLC

Con el objetivo de conocer la concentración de IND en sangre a los diferentes tiempos tras la administración de una única dosis de fármaco, se selecciona la técnica más adecuada, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Preparación de las muestras patrón

Se pesan 25 mg de IND y se llevan a un matraz aforado de 25 ml. Se añaden 15 ml de fase móvil de limpieza (agua purificada: acetonitrilo (35:65) (v/v)) y se lleva a agitación en un agitador tipo Vortex[®], durante 2 minutos a 2400 rpm, hasta su completa disolución.

De la solución madre obtenida (1000 µg/ml) se preparan y analizan distintas diluciones realizadas con distintas alíquotas de la solución madre y 2 ml de acetonitrilo (0,16; 0,24; 0,32; 0,61; 0,87 y 1,11 µg/ml). Para su análisis en HPLC, todas las muestras se filtran a través de un filtro Millipore[®] HVLP de 0,45 µm.

La figura 3.20 muestra el cromatograma representativo de la IND formulación patrón de 75 µg/ml. En estas condiciones cromatográficas, el tiempo de retención de la IND es de 7,8±0,1 minutos.

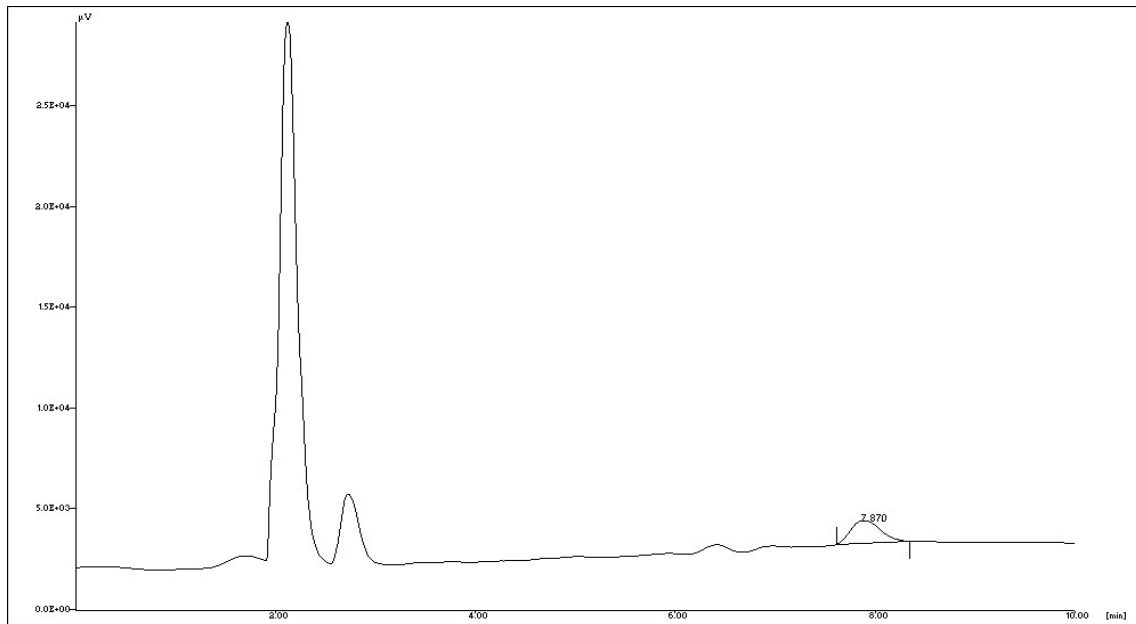


Figura 3.20: Cromatograma de un patrón de IND de 75 µg/ml.

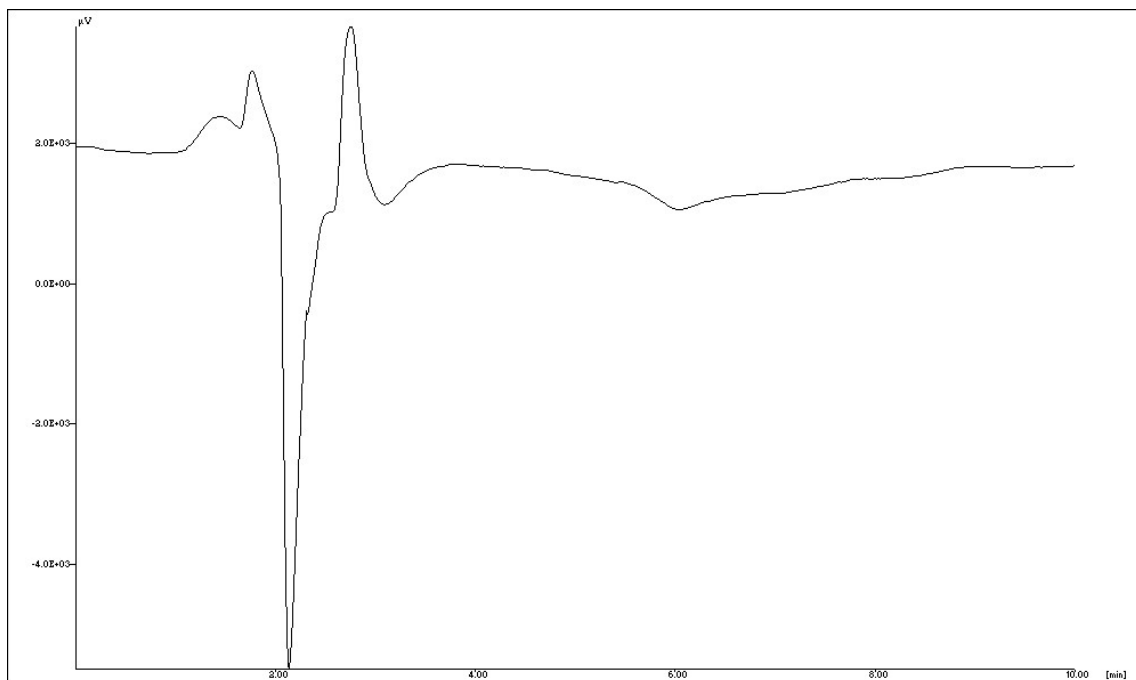


Figura 3.21: Cromatograma de la fase móvil.

En la figura 3.21 se puede observar el cromatograma representativo de la fase móvil. En vista de estos cromatogramas, podemos afirmar que no se observan interferencias en el tiempo de retención de la IND.

La recta de calibrado cumple la ley de Lambert-Beer:

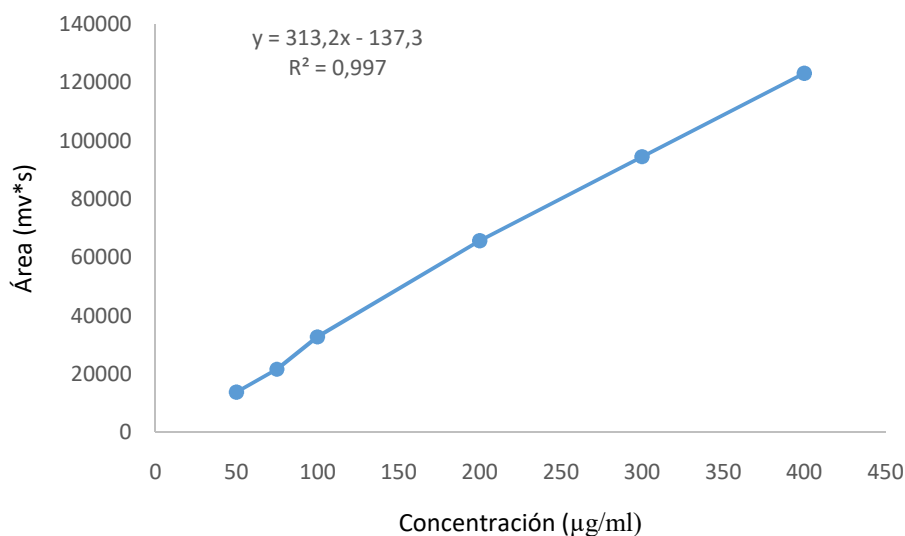


Figura 3.22: Recta de calibrado de las muestras patrón.

La recta de calibrado de las muestras patrón se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\text{Área} = 313,24 \times C - 137,34 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$r^2 = 0,9976$$

$$n = 6$$

$$\text{Rango} = 0,16 - 1,11 \mu\text{g/ml}$$

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir que existe una relación directa entre las concentraciones y áreas dentro del intervalo de concentración utilizado.

Administración de las formulaciones

Los estudios en animales se realizaron en ratas Wistar macho (270-310 g). Los animales que recibieron las formulaciones por vía oral se mantuvieron en ayuno durante la noche, con acceso libre al agua antes de la administración del fármaco.

La evaluación farmacocinética se realizó después de la administración oral ($n = 6$) de las siguientes formulaciones: IND materia prima y DS-1:0,12:5-NaOH en dos días distintos a una misma dosis de 5 mg/kg. Esta dosis se seleccionó teniendo en cuenta que es una dosis no tóxica en ratas, siendo muy inferior a la tóxica (18 mg/kg) (Cattani, et al., 2008 y Helmy, et al., 2018).

Las formulaciones se administraron en forma de suspensión acuosa (carboximetil celuosa sódica al 0,75%). Después de la administración, se recogieron aproximadamente 700 µL de sangre heparinizada a distintos tiempos hasta 24 h, (Cattania y Dalla-Costa, 2008) se centrifugaron (7000 rpm/10 min a 21°C) y el plasma se congeló a -20°C hasta su análisis por HPLC.

Extracción y análisis de las muestras

En el momento del análisis en la cromatografía, se tomaron las distintas muestras plasmáticas heparinizadas a los 60, 90, 120, 150, 240, 360, 480, 1440 min tras la administración de IND y de la DS, se descongelaron, se les añadió 2 volúmenes de acetonitrilo por cada volumen de plasma, con el fin de provocar la precipitación de las proteínas plasmáticas y así evitar posibles interferencias en el análisis cromatográfico. Las muestras se agitaron en un agitador tipo Vortex[®] durante 2 min a 2500 r.p.m. y a continuación se sometieron a una centrifugación de 5000 r.p.m. durante 10 minutos y una vez finalizado el proceso se tomó el sobrenadante.

3.2.7. Estudios *in vivo* de biodisponibilidad tópica

3.2.7.1. Introducción

A diferencia del estudio de la biodisponibilidad del fármaco tras la administración de formulaciones orales, la evaluación de la biodisponibilidad tópica está limitada por la escasa correlación *in vitro* / *in vivo*, debida a los complejos procesos de absorción tópica de los fármacos (Torrado-Durán, et al., 1992).

Por tanto, el estudio de la biodisponibilidad tópica es un reto y son muchas las metodologías propuestas para evaluar la biodisponibilidad tópica y la bioequivalencia de los productos dermatológicos de acción local (Lehman, et al., 2011; Shah, et al., 2015).

Entre otras técnicas para estudiar la biodisponibilidad y la bioequivalencia tópica se encuentran pruebas de permeación de piel humana *in vitro*, microdiálisis, extracción de cintas en el estrato córneo y técnicas ópticas y espectroscópicas no invasivas. (Yacobi, et al., 2014; Raney, et al., 2015; Bodenlenz, et al., 2017).

El objetivo de este punto es evaluar la biodisponibilidad tópica de un gel de la DS-1:0,12-5-NaOH, y compararla con la de la IND materia prima formulada en gel tópico.

3.2.7.2. Materiales y Métodos

Materiales

Se ha agrupado el material en: materias primas, reactivos, soluciones e instrumental.

Materias primas

- IND. Fagron Iberica[®] SAU, España.
- LSS. Fischer Scientific[®], Inglaterra.
- L-HPC. Shin-Etsu[®], Tokio, Japón.

- HPG. Fagron Iberica[®] SAU, España.
- Transcutol[®]. Gattefossé[®] S.A., Francia.

Soluciones

- Agua desionizada obtenida por un sistema Milli-Q[®]. Millipore[®], Estados Unidos.
- Disolución normalizada de ácido acético 2 N según la USP 42: se añaden 116 ml de ácido acético glacial en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 4,5 según la USP 42: se añaden 2,99 g de acetato sódico trihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en un matraz aforado de 1000 ml y añaden 14 ml de ácido acético 2N y se enrasa con agua destilada.

Instrumental

- Espectrofotómetro UV-VIS Jasco V730. Jasco[®], Japón.

Métodos

La elaboración de los geles se detalla posteriormente en el punto 5 de esta tesis.

La extracción de cintas en el estrato córneo es uno de los métodos utilizados para evaluar la biodisponibilidad tópica, y fue objeto de una guía de la Food and Drug Administration (FDA) (US FDA, 1998), que ahora se encuentra retirada, e involucra la recolección del estrato córneo usando cintas adhesivas después de la aplicación de una formulación que contiene medicamentos; posteriormente, el fármaco en el estrato córneo puede ser extraído y cuantificado.

Para realizar la evaluación de la biodisponibilidad tópica de indometacina, tras la aplicación de dos geles, uno de ellos compuesto por IND materia prima y el otro por una DS de IND, que se ha seleccionado por poseer las mejores características de velocidad de disolución, hemos seguido el método del fármaco remanente presente en la piel, a diferentes tiempos realizado por los autores Torrado-Durán, et al., 1992.

- 1) Se calcula la cantidad teórica a tiempo 0 (Q_0):

Para ello se pesan 200 mg de los distintos geles recién preparados, por triplicado, calculándose la cantidad relativa a cada muestra que se coloca en la piel (equivalente a 5,2 mg en 405,2 mg de gel de IND materia prima y 431,85 mg de gel de DS).

2) Calculamos la cantidad de IND remanente a tiempo t (Q_{rt}):

Se recoge el gel no absorbido de la piel a los distintos tiempos, y se calcula la cantidad de IND disolviendo el gel en 10 ml de etanol y enrasando con tampón pH 4,5 hasta 100 ml. Posteriormente, se realiza la cuantificación de la cantidad remanente de IND, por espectrofotometría UV-VIS.

3) Cálculo del % de IND no absorbido ($\%_r$):

$$\%_r = \frac{Q_{rt}}{Q_0} \cdot 100$$

4) Cálculo del % absorbido:

$$\% \text{ Absorbido} = 100 - \% \text{ remanente}$$

- Para estudiar la liberación de IND desde las dos formulaciones, se pusieron el equivalente a 5,2 mg de IND (dosis para administración tópica según ficha técnica de Reusin[®] (AEMPS, 2016) en seis áreas de $2 \times 2 \text{ cm}^2$ repartidas entre las dos partes internas de los antebrazos. La cantidad no absorbida de formulación se retiró a los 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min y 60 min. Estas cantidades residuales se pesaron y a continuación se midió la absorbancia para determinar su concentración utilizando la espectroscopía UV-VIS a partir de la recta de calibrado $y = 0,0489 + 0,0066x$, obtenida tras la validación del método espectrofotométrico para el espectrofotómetro UV-VIS Jasco[®] V-730 (Torrado-Durán, et al., 1992).

Este estudio fue llevado a cabo de forma aleatoria y cruzada. Se realizó sobre ocho voluntarios sanos, 7 mujeres y 1 hombre, con una media de edades de 36 ± 8 años de edad. (Torrado-Durán, et al., 1992).

3.3. Bibliografía

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2015). Real Farmacopea Española (RFE). 5ª ed.Madrid.
- Bodenlenz, M., Tiffner, K.I., Raml, R., Augustin, T., Dragatin, C., Birngruber, T., Schimek, D., Schwagerle, G., Pieber, T.R., Raney, S.G., Kanfer, I. y Sinner, F., (2017): “Open flow microperfusion as a dermal pharmacokinetic approach to evaluate topical bioequivalence”, *Clinical Pharmacokinetics*, 56, pp. 91–98.
- Cattani, V.B., Pohlmann, A.R., Dalla Costaa, T. (2008): “Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules”, *International Journal of Pharmaceutics*, 363, pp. 214–216
- Cattania, V.B., Pohlmann, A.R., Dalla-Costa, T. (2008): “Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules”, *Int J Pharm*, 363, pp. 214–216.
- EcuRed (2018): *Microscopio electrónico*. Disponible en: https://www.ecured.cu/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_barrido. [Consulta: 19 de marzo de 2019].
- Groenewoud, W. M. (2001): *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*, Estados Unidos, Elsevier.
- Helmy, M.W., Helmy, M.M., El-Mas, M.M. (2018): “Enhanced lipoxigenase/LTD4 signaling accounts for the exaggerated hypertensive and nephrotoxic effects of cyclosporine plus indomethacin in rats”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, pp. 309-316.
- International Conference of Harmonisation (2005): ICH Q2 (R1): *Validación de métodos analíticos*.
- Lehman, P.A., Raney, S.G., Franz, T.J., (2011): “Percutaneous absorption in man: *in vitro*- *in vivo* correlation”, *Skin Pharmacology and Physiology*, 24, pp. 224-230.
- Mettler Toledo (2018): *Calorímetro diferencial de barrido*. Disponible en: https://www.mt.com/mx/es/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/TA_Family_Browse/HP_DSC.html. [Consulta: 21 de marzo de 2019].

- Montes Ruiz-Cabello, F.J. (2009): *Efecto de la rugosidad y heterogeneidad superficial en fenómenos de mojado*, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Facultad de Farmacia. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/18197759>. [Consulta: 29 de mayo de 2019].
- Raney, S.G., Franz, T.J., Lehman, P.A., Lionberger, R., y Chen, M.L., (2015): "Pharmacokinetics-based approaches for bioequivalence evaluation of topical dermatological drug products", *Clinical Pharmacokinetics*, 54, pp. 1095–1106.
- Shah, V.P., Maibach, H.I., Jenner, J. (Eds.). (2015): *Topical Drug Bioavailability Bioequivalence and Penetration*, Berlín, Springer.
- Torrado, S., Torrado, J.J. y Cadórniga, R. (1992): "International Journal of Pharmaceutics, Topical application of albumin microspheres containing vitamin A", *Drug release and availability*, 86, pp. 147-152.
- Universidad de Málaga (2006): *Difracción de Rayos X*. Disponible en: <http://www.xdataser.com/index.php/difraccion-de-rayos-x/>. [Consulta: 20 de marzo de 2019]
- FDA. Draft Guidance: Guidance for Industry: topical dermatological drug product NDAs and ANDAs- in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER); 1998.
- USP 42 (United States Pharmacopoeia 42). 2019.
- Yacobi, A., Shah, V.P., Bashaw, E.D., Benfeldt, E., Davit, B., Ganes, D., Ghosh, T., Kanfer, I., Kasting, G.B., Katz, L., Lionberger, R., Lu, G.W., Maibach, H.I., Pershing, L.K., Rackley, R.J., Raw, A., Shukla, C.G., Thakker, K., Wagner, N., Zovko, E. y Lane, M.E., (2014): "Current challenges in bioequivalence, quality, and novel assessment technologies for topical products", *Pharmaceutical Research*, 31, pp. 837–846.

DISPERSIONES SÓLIDAS DE IND
FORMADAS EN MEDIO
TAMPONADO DE FOSFATO

4. Dispersiones sólidas de IND formadas en medio tamponado de fosfato

4.1. Introducción

En este capítulo, se desarrollan nuevas formulaciones para tratar de mejorar la velocidad de disolución de la IND mediante la preparación de DS con el método de liofilización.

El grado de alteración de la cristalinidad de la IND se evaluó considerando la influencia del método de preparación y la adición de L-HPC, para ello se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM), la difracción de rayos X (XRPD) y la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Con el fin de obtener DS de IND, se ha utilizado como matriz polimérica L-HPC y como tensioactivo LSS.

En primer lugar se ha llevado a cabo la fase de preformulación, que se basó en encontrar un disolvente no orgánico en el que el fármaco presentase una buena solubilidad, lo que no fue fácil dada su escasa solubilidad en agua (0,937 mg/l a 25 °C). A pesar de que la IND presenta una buena solubilidad en disolventes orgánicos como etanol, acetona, éter o aceite de ricino, la evaporación de los mismos causa importantes daños en los liofilizadores, por ello decidimos descartar estos disolventes.

Por otra parte, se estudió la influencia del surfactante LSS en la solubilidad de la IND en medios acuosos.

A continuación, se desarrolló el proceso de preparación de DS de IND mediante liofilización.

Para realizar la caracterización de las formulaciones preparadas en el paso anterior, se llevaron a cabo estudios de determinación del ángulo de contacto, estudios de velocidad de disolución, Microscopía electrónica de barrido (SEM), Difracción de rayos (XRPD) y Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Materiales

Se ha agrupado el material en: materias primas, reactivos, soluciones e instrumental.

Materias primas

- IND. Fagron Iberica[®] SAU, España.
- LSS. Fischer Scientific[®], Inglaterra.
- L-HPC. Shin-Etsu[®], Tokio, Japón.

Reactivos

- Cloruro de potasio (KCl). Panreac Química[®] S.A., España.
- Ácido bórico (H_3BO_3). Montplet & Esteban[®] S.A., España.
- Ácido acético glacial. Calidad PRS- Codex. Panreac Química[®] S.A., España.
- Acetato sódico PRS. Panreac Química[®] S.A., España.
- Dihidrógeno fosfato de potasio PRS. Panreac Química[®] S.A., España.
- Hidróxido sódico PRS. Panreac Química[®] S.A., España.

Soluciones

- Agua desionizada obtenida por un sistema Milli-Q[®] (Millipore[®], Estados Unidos).
- Disolución de ácido bórico y cloruro potásico 0,2 M según la USP 42: se disuelven 12,37 g de ácido bórico (H_3BO_3) y 14,91 g de cloruro potásico (KCl) en agua destilada y se diluyen hasta 1000 ml con agua desionizada.
- Tampón PBS pH 8,4 según la USP 42: se añaden 50 ml de una disolución de ácido bórico y cloruro potásico 0,2 M y 8,6 ml una disolución de hidróxido sódico 0,2 M en un matraz aforado de 200 ml y se enrasa con agua destilada.

- Disolución ácido clorhídrico 0,1 N (pH 1,2) según la USP 42: se añaden 8,3 ml de una disolución de ácido clorhídrico al 37% en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Disolución normalizada de ácido acético 2 N según la USP 42: se añaden 116 ml de ácido acético glacial en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 4,5 según la USP 42: se añaden 2,99 g de acetato sódico trihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en un matraz aforado de 1000 ml y añaden 14 ml de ácido acético 2N y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 6,8 según la USP 42: se añaden 50 ml de una disolución de fosfato potásico monobásico 0,2 M y 22,4 ml de una disolución de hidróxido sódico 0,2 M en un matraz aforado de 200 ml y se enrasa con agua destilada.
- Solución de NaOH 0,2 M.

Instrumental

- Agitador magnético-calefactor (Velp® científicar, Alemania).
- Balanza Mettler AG 104 (Mettler-Toledo® GmbH, Suiza).
- Equipo de liofilización: Telstar LyoQuest® (Tarrasa, España).
- pHmetro Mettler Toledo MP230 (Mettler-Toledo® GmbH, Suiza).
- Congelador Liebherr GT 2121 (Liebherr®, Alemania).
- Baño de agitación Memmert Wbath-001 (Fisher Scientific®, Estados Unidos).

4.2.2. Métodos

Estudio del coeficiente de solubilidad de la IND en los diferentes tampones

Para llevar a cabo el estudio del coeficiente de solubilidad del fármaco en los diferentes tampones se ha utilizado el método de agitación, para ello se siguen los pasos siguientes:

1. Se suspende un exceso de IND (30 mg) en 4 ml del correspondiente disolvente y se someten a una agitación constante a 50 rpm, a 37°C durante 24 h.

2. Posteriormente las muestras se atemperan a 25°C en un baño termostatzado.

3. Se filtran a través de un filtro de 0,45 µm.

4. Se realiza la lectura espectrofotométrica de IND a 262 nm ó 266 nm para pH 4,5 y 6,8, respectivamente.

El estudio del coeficiente de solubilidad de la IND en los diferentes pH se realiza por triplicado (n=3), los resultados se muestran en la tabla 4.1.

Como se esperaba se obtuvieron resultados de solubilidad de la IND muy bajos,-siendo el Cs a pH 1,2 de 0,003 mg/ ml y se incrementó notablemente en los medios tampón a pH 4,5 (0,82 mg/ ml), pH 6,8 (1,22 mg/ ml) y pH 8,4 (3,11 mg/ml). Este aumento de la solubilidad del fármaco a medida que se incrementa el pH del medio de disolución por encima de su pKa (4,5) es debido a la ionización parcial de su molécula, que se presenta principalmente en su forma aniónica.

Tabla 4.1: Coeficientes de solubilidad de la IND en diferentes tampones a 37º C y su desviación estándar (σ).

Solución tampón	Cs (mg/ ml)	σ
1,2	0,003	1,60
4,5	0,82	0,89
6,8	1,22	0,04
8,4	3,11	0,69

En vista de estos resultados se seleccionó el tampón pH 8,4 para la formulación de las diferentes DS. Sin embargo, debido a la gran cantidad de tiempo necesaria para la completa disolución del fármaco en el tampón, se agregó LSS en dos concentraciones diferentes (0,075mg/ ml y 0,125mg/ ml) con el fin de incrementar la solubilidad del fármaco.

Aunque con ambas concentraciones de LSS (0,075mg/ ml y 0,125mg/ ml) se consigue disolver completamente la IND, con la segunda concentración el tiempo necesario para alcanzar ésta es muy inferior, pasando de 3 horas para la concentración de 0,075mg/ ml a 1 hora para la concentración de 0,125mg/ml.

Método para la preparación de las distintas formulaciones de IND elaboradas con tampón fosfato

Las DS de IND se elaboraron por el método de liofilización utilizando L-HPC como matriz polimérica. Se prepararon DS con proporciones IND:LSS:L-HPC 1:0,06:0; 1:0,12:0; 1:0,12:5; 1:0,12:10 y 1:0,12:20 (p/p/p). Las cantidades correspondientes de IND y L-HPC se disolvieron en 20 ml de una disolución con 0,125 mg/ ml de LSS en tampón 8,4, excepto la DS-1:0,06:0 que se disolvió en una disolución de 0,075 mg/ ml de LSS. Para realizar la liofilización, las muestras se congelaron a -40°C durante al menos 24 h y a continuación se introdujeron en el estante del liofilizador a 5°C . Después de alcanzar el equilibrio térmico, la temperatura de la plataforma se redujo a -40°C y el producto se mantuvo a esta temperatura durante 2 h. Posteriormente, el sistema se evacuó a una presión de 0,04 mbar y la temperatura del estante se ajustó a -35°C y se mantuvo durante 4 h, antes de elevarse a -20°C (2 h). A continuación, cada una de las diferentes formulaciones fue molida y tamizada para obtener un tamaño de partícula de 0,125–0,500 mm (de la Torre-Iglesias et al., 2014). Transcurridos 5 minutos los viales se taparon y fueron almacenados en un desecador con silicagel a temperatura ambiente ($22\text{--}24^{\circ}\text{C}$).

La MF-1:0,12:20 (p/p/p) se preparó mezclando manualmente las correspondientes cantidades de IND y matriz polimérica con un tamaño de partícula de 0,125–0,500 mm, en un mortero de cerámica utilizando una espátula. DS-0:0,12:0 se elaboró siguiendo el método descrito anteriormente, pero sin incluir IND.

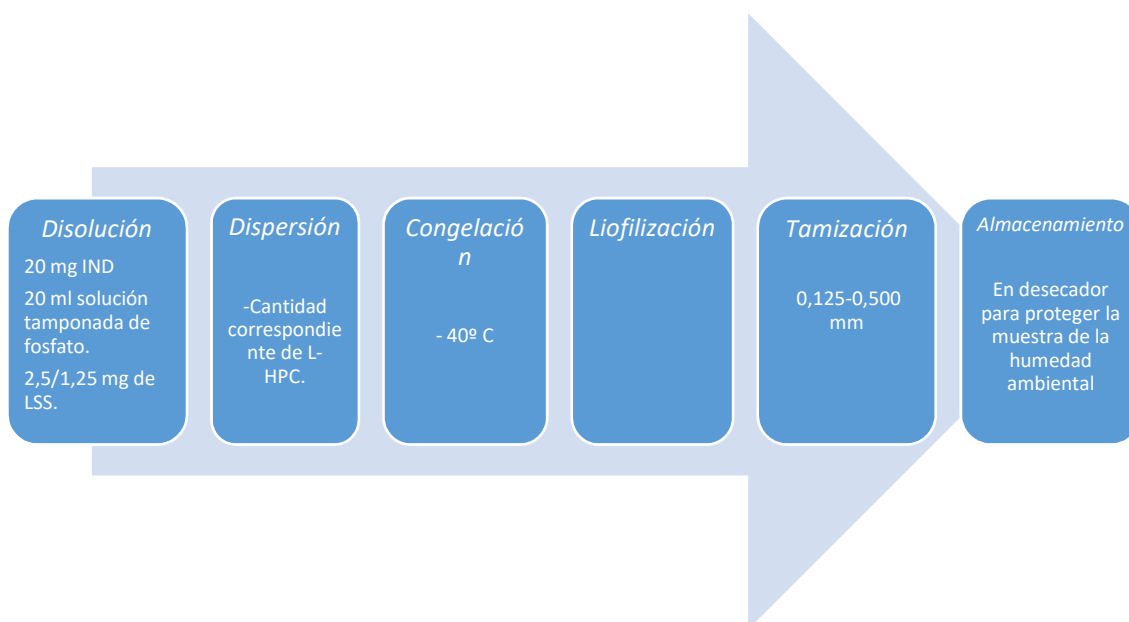


Figura 4.1: Proceso de elaboración de las dispersiones sólidas elaboradas en medio tamponado de fosfato.

Ángulo de contacto.

Ver apartado 3 de esta tesis, “Materiales y Métodos”.

Velocidad de disolución.

Ver apartado 3 de esta tesis, “Materiales y Métodos”.

Microscopía electrónica de barrido (SEM), Difracción de rayos X (XRPD) y Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Ver apartado 3 de esta tesis, “Materiales y Métodos”.

Análisis estadístico de datos

Los resultados obtenidos de los ensayos de disolución de las diferentes formulaciones se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la diferencia estadística mínima de Fisher (LSD) para comparaciones múltiples. Un valor de P inferior a 0,05 se consideró significativo.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Ángulo de contacto

Las mediciones del ángulo de contacto con agua desionizada se realizaron sobre las muestras comprimidas de las diferentes dispersiones sólidas (DS-1:0,12:0; DS-1:0,12:5; DS-1:0,12:20) y de mezcla física (MF-1: 0,12: 20) y de IND.

Se sabe que la rugosidad de la superficie y el posible hinchamiento del polímero pueden influir en el comportamiento de humectación (Dahlberg et al., 2010). Como puede verse en la figura 4.1 el ángulo de contacto del agua en los comprimidos se fue reduciendo gradualmente a medida que pasaba el tiempo de 1s a 4s.

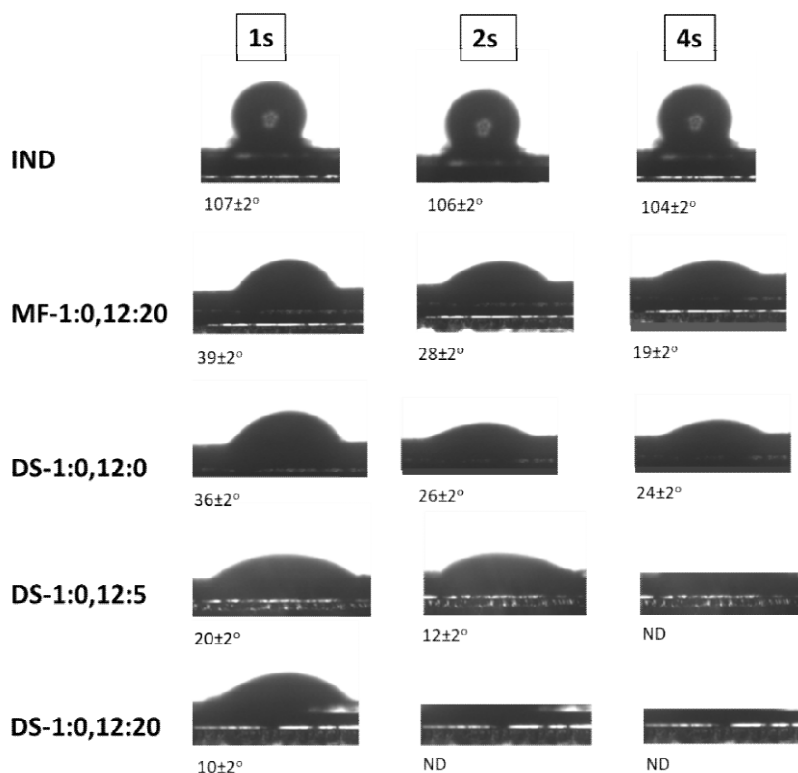


Figura 4.2: Ángulo de contacto del agua sobre las diferentes formulaciones de IND formadas en medio tamponado de fosfato.

El ángulo de contacto del agua sobre las muestras comprimidas de IND materia prima fue el más alto ($107 \pm 2^\circ$ después de 1 s), lo que se atribuyó a la mayor hidrofobicidad de este fármaco.

Por otro lado, la mezcla física obtuvo valores de ángulo de contacto mucho más pequeños ($39 \pm 2^\circ$ después de 1 s), probablemente debido a su composición: L-HPC y LSS que aumentan su humectabilidad.

La DS-1:0,12:20 presentó el ángulo de contacto más pequeño ($15 \pm 2^\circ$ después de 1 s), mucho más pequeño que la mezcla física con la misma relación IND: L-HPC, lo que puede deberse a un aumento en la humectabilidad de la formulación, después del proceso de liofilización. (Dharmalingam y Anandalakshmi, 2019).

Además, se observa que la DS sin matriz, DS-1: 0,12:0, tiene un ángulo de contacto mayor que la DS-1:0,12:5, una diferencia que aumenta con el aumento de la carga de L-HPC en la formulación (DS -1:0,12:20), esto podría deberse a la humectabilidad que aporta la L-HPC.

En vista de estos resultados, se podría concluir que existe una gran influencia del L-HPC en la humectabilidad de las muestras.

4.3.2. Ensayos de velocidad de disolución

Para evaluar las diferencias en la velocidad de disolución de diferentes formulaciones de IND, se propone utilizar un tampón ácido (pH 1,2) y dos medios intestinales (pH 4,5 y pH 6,8). Estos medios han sido utilizados por diferentes autores para comparar diferentes formulaciones de fármacos que presentan grandes cambios en la solubilidad durante su tránsito gastrointestinal (Oishi, et al., 2011; El-Sabawi y Hamdan, 2014; Stuart, et al., 2014).

En el medio ácido (pH 1,2), los datos de disolución mostraron una baja disolución del fármaco, sólo el $5,22 \pm 0,71\%$ a los 120 min y menos del $12,84 \pm 0,48\%$ de IND se disolvió a partir del fármaco puro a las 24 horas. La MF-1:0,12:20, mostró un perfil de disolución similar, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) (Figura 4.3).

La adición de LSS a las DS produce un aumento en los perfiles de disolución de IND. Debido a esto, las formulaciones DS-1:0,06:0 y DS-1:0,12:0, muestran las siguientes cantidades de IND disuelta a los 120 min: $28,76 \pm 1,18\%$ y $37,80 \pm 1,10\%$, respectivamente. Este incremento significativo en la velocidad de disolución de las DS con mayor cantidad de LSS podría atribuirse a la presencia de éste en la superficie de las partículas de IND. Esta proporción (IND: LSS 1: 0,12) es necesaria para producir una interacción más rápida entre el fármaco y el medio de disolución (García-Herrero et al. 2017).

La velocidad de disolución del fármaco se mejoró significativamente ($P < 0,05$) en todas las DS a este pH; la cantidad de IND disuelta (DS-1: 0,12: 0, DS-1:0,12:5, D-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20) estaba entre $37,80 \pm 1,10\%$ y $41,79 \pm 1,72\%$ a 120 min, y entre $41,67 \pm 2,88\%$ y $44,67 \pm 2,68\%$ a las 24 h respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las cuatro DS en estos tiempos. Sin embargo, después de cortos períodos de tiempo (15 min) en este medio ácido, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las DS con mayores cantidades de L-HPC (DS-1:0,12:10, DS-1:0,12:20) y menores cantidades (DS-1:0,12:0, DS-1:0,12:5).

Estos bajos porcentajes de fármaco disuelto en tampón ácido (pH 1,2) fueron observados previamente por otros autores que obtuvieron valores disueltos inferiores al 6,2% de IND a las 24 h (Saeedi, et al., 2011).

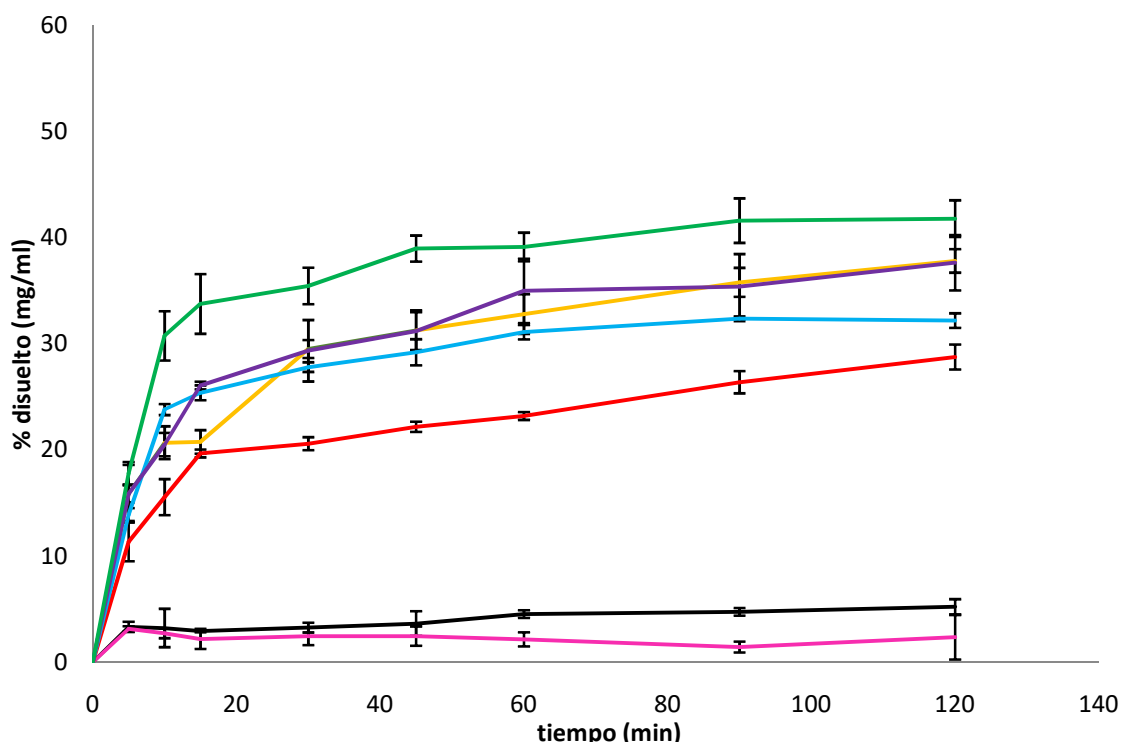


Figura 4.3: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 1,2. — IND materia prima, — MF-1:0,12:20; — DS:0,06:0; — DS:1:0,12:0; — DS:1:0,12:5; — DS:1:0,12:10; — DS:0,12:20.

A pH 6,8 (medio intestinal), los perfiles de disolución de la IND materia prima, la mezcla física MF-1:0,12:20 y las diferentes DS se muestran en la figura 4.4. La IND-MP y la MF-1:0,12:20 mostraron los peores perfiles de disolución, presentando diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) entre los porcentajes disueltos de principio activo a los 5 minutos ($25,23 \pm 3,05\%$ disuelto con la IND materia prima y $49,75 \pm 0,80\%$ disuelto con la MF-1:0,12:20). También se observaron, diferencias significativas ($P<0,05$) entre estas dos formulaciones a los 120 minutos: IND materia prima ($76,56 \pm 6,0\%$) y MF-1: 0,12:20 ($93,90 \pm 5,53\%$), lo que se explica por la presencia de LSS en esta última (MF).

También se pudo observar en el porcentaje de IND disuelta obtenido con la DS-1:0,06:0 y la DS-1:0,12:0 una diferencia significativa ($P<0,05$) a los 120

min, la cantidad disuelta fue del $83,33 \pm 1,16\%$ y del $90,23 \pm 1,28\%$ respectivamente, alcanzando el 100% disuelto a las 24 h para ambas DS. Además, la DS-1:0,12:0, presentó una alta cantidad de sustancia activa disuelta a los 5 minutos ($90,55 \pm 1,31\%$), que es similar a la cantidad de IND disuelta a partir de la MF-1:0,12:20 a los 120 min ($93,90 \pm 5,53\%$).

Este aumento en la velocidad de disolución después del proceso de liofilización puede estar relacionado con el aumento de la humectabilidad observado en las mediciones del ángulo de contacto.

Las DS con mayores cantidades de L-HPC (DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20) presentan un aumento significativo en la cantidad de principio activo disuelto a los 5 min ($95,21 \pm 1,16\%$ y $93,83 \pm 2,40\%$ respectivamente) en comparación con la dispersión sólida sin L-HPC (DS-1:0,12:0) que presenta un porcentaje de IND disuelto del $90,55 \pm 1,31\%$. El aumento en la cantidad de IND disuelta a partir de las DS con mayores cantidades de la matriz (L-HPC) podría atribuirse a diversos factores tales como una disminución de la cristalinidad del fármaco, así como de la tensión superficial del medio producida por la L-HPC que produce una mejor humectación de la superficie del fármaco hidrófobo (García-Herrero et al., 2017; Ambike, et al., 2004). A este pH 6,8, todas las DS presentan tasas muy altas de velocidad de disolución. Por lo tanto, a este pH, no es posible observar diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los perfiles de disolución de las diferentes DS. Otros autores obtuvieron resultados similares utilizando como medio de disolución tampón de pH 7,4; hallando una cantidad de IND disuelta a partir de sus DS de $72,5 \pm 1,0\%$ a los 90 minutos (El-Badry, et al., 2009). El uso de medios de tampón con pH cercano al valor de pKa de IND (4,5) produce una disminución de la solubilidad de IND (Saeedi et al., 2011).

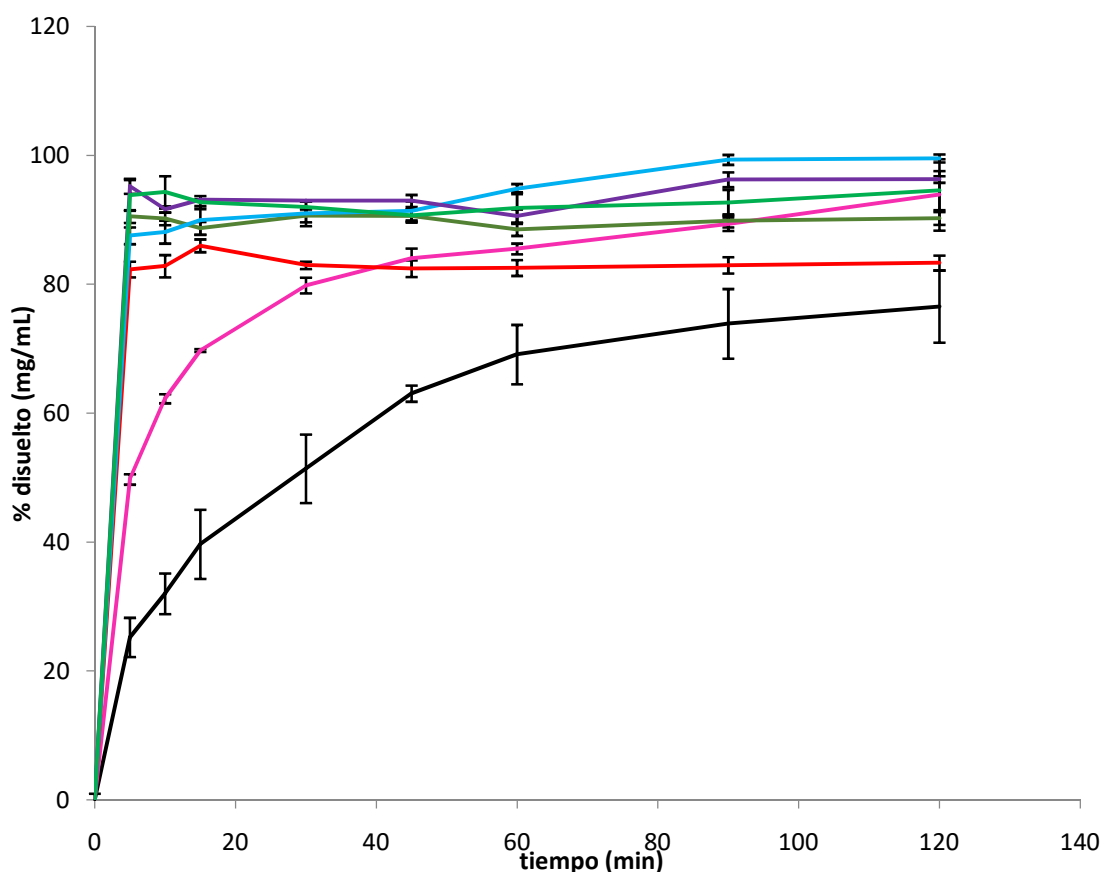


Figura 4.4: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 6,8. — IND materia prima, — MF-1:0,12:20; — DS:0,06:0; — DS:1:0,12:0; — DS:1:0,12:5; — DS:1:0,12:10; — DS:0,12:20.

Por lo tanto, con el objetivo de obtener perfiles de disolución más lentos que permitan observar diferencias en los porcentajes de disolución entre las diferentes formulaciones, los ensayos de disolución se realizaron también a pH 4,5 (Figura 4.5).

Los perfiles de disolución de IND materia prima, la mezcla física 1:20 (MF-1:0,12:20) y las diferentes DS con L-HPC (DS-1:0,12:0; DS-1: 0,12:5, DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20) a pH 4,5 se ilustran en la Figura 4.5.

Como cabía esperar, a pH 4,5, la IND materia prima y MF-1: 0,12:20 exhibieron los peores perfiles de disolución. Las cantidades de IND disuelta desde el fármaco puro y a partir de la MF-1:0,12:20 a los 120 minutos fueron del $7,06 \pm 0,46$ y $20,26 \pm 0,80\%$ respectivamente.

A las 24 horas, las cantidades de IND disuelta a partir de la IND pura y de la MF-1: 0,12:20 fueron $23,07 \pm 2,33\%$ y $29,88 \pm 1,25\%$, respectivamente. Al igual

que sucedió en los ensayos de velocidad de disolución a pH 6,8, la mezcla física presentó una mejora estadísticamente significativa ($P<0,05$) en las propiedades de disolución en comparación con el fármaco puro a los 120 minutos. Esta alta cantidad de sustancia activa disuelta a partir de la MF-1:0,12:20 podría estar relacionada con la presencia de LSS en esta formulación y a las propiedades humectantes de la L-HPC, como se observa en las mediciones de humectabilidad llevadas a cabo.

La cantidad de IND disuelta a partir de la DS-1:0,12: 0 a los 120 minutos fue $42,84 \pm 2,59\%$. Tal y como sucedió a pH 6,8, la DS-1: 0,12: 0 mejora significativamente ($P<0,05$) el perfil de disolución de la IND materia prima y la velocidad de disolución de la MF-1:0,12:20.

Todas las DS mejoraron significativamente ($P<0,05$) el perfil de disolución de la IND y de la MF-1:0,12:20, como ocurrió a pH 6,8.

De manera similar a lo observado a pH 6,8, el porcentaje de IND disuelto a partir de la DS-1:0,06:0 fue $27,32 \pm 0,09\%$ a los 120 min y $29,01 \pm ,43\%$ a las 24h y a partir de la DS-1:0,12:0 fue $42,84 \pm 2,59\%$ a los 120 min y $41,67 \pm 2,88\%$. Por tanto, a este pH, se produce un aumento estadísticamente significativo ($P<0,05$) en la cantidad de IND disuelta a partir de las dispersiones sólidas con mayor cantidad de LSS. Las dispersiones sólidas con mayores cantidades de LSS mostraron porcentajes de disolución de IND superiores al 90% a los 120 minutos.

Además, las dispersiones sólidas con mayores cantidades de L-HPC (DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20) presentaron un aumento estadísticamente significativo ($P<0,05$) en la cantidad disuelta de IND, probablemente debido a que la propia L-HPC podría actuar como un solubilizador débil en las formulaciones, así como evitando la agregación del principio activo (Tantishaiyakul y Kaewnopparat 1999; Kawabata, et al., 2010). A la vista de los resultados, se puede concluir que existe evidencia de que todas las DS lograron alcanzar el 100% de IND disuelta antes que la IND y que la mezcla física. Las DS 1:0,12:10 y 1:0,12:20 lograron alcanzar un 40% de principio activo disuelto a los 120 min.

Estos incrementos significativos ($P<0,05$) en los tiempos de disolución podrían tener una gran influencia en su eficacia terapéutica

Por otra parte, la inclusión de bajas cantidades de L-HPC en las DS no logró aumentos significativos ($P<0,05$) en los porcentajes de IND disueltos a los 120 minutos ($42,84 \pm 2,59\%$ de DS-1:0,12:0 y $42,87 \pm 3,56\%$ de DS-1:0,12:5, respectivamente). Cabe sospechar que estas bajas cantidades de L-HPC no evitan la aglomeración de partículas IND durante el proceso de disolución.

Sin embargo, las DS con mayor cantidad de L-HPC (DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20) aumentan la humectabilidad y favorecen una disolución más rápida en los tiempos iniciales de disolución como se puede observar en las mediciones del ángulo de contacto. Así, a los 5 minutos las cantidades de fármaco disueltas desde la DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20 fueron $32,47 \pm 2,95\%$, $45,69 \pm 4,26\%$ y $54,01 \pm 2,26\%$ respectivamente.

Las diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) observadas entre las diferentes DS a este pH podrían atribuirse a la menor solubilidad del fármaco en este medio, posiblemente porque la solubilidad de IND depende del pH: a un pH bajo (1,2) tiene propiedades de solubilidad deficientes, mientras que su solubilidad aumenta considerablemente a un pH alto (6,8). Sin embargo, el uso de L-HPC en DS se justificaría a un pH duodenal de 4,5, crítico para la IND, ya que aumenta significativamente la velocidad de disolución de las formulaciones con altas cantidades de L-HPC.

Estos resultados nos permiten considerar el pH 4,5 como un medio discriminativo, válido para los perfiles de disolución de nuestras diferentes DS con cantidades distintas de L-HPC.

Además, este medio fue adecuado para evaluar cómo la presencia de L-HPC produce una disminución de la tensión superficial del medio que resulta en una mejor humectación de la superficie del fármaco hidrófobo (García-Herrero et al., 2017; Ambike et al., 2004). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el ángulo de contacto.

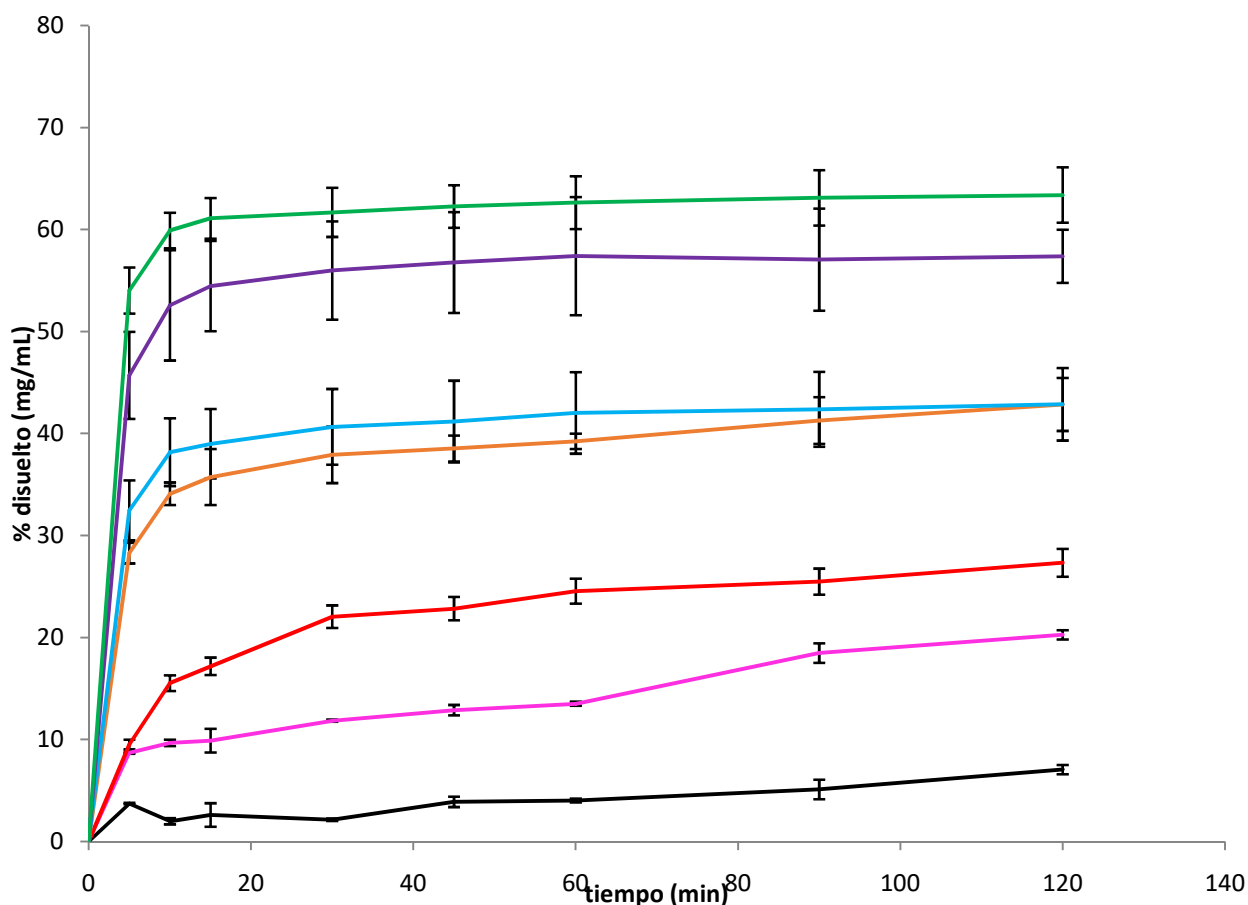


Figura 4.5: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 4,5. — IND materia prima, — MF-1:0,12:20; — DS:0,06:0; — DS:1:0,12:0; — DS:1:0,12:5; — DS:1:0,12:10; — DS:0,12:20.

4.3.3. SEM

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para estudiar las características de superficie y morfológicas de diferentes muestras (IND materia prima, DS-0:0,12:0, DS-1:0,12:0, DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10, DS-1:0,12:20, MF-1:0,12:20 y L-HPC).

La IND materia prima presentaba cristales heterogéneos de diferentes tamaños con bordes (Figura 4.6.a).

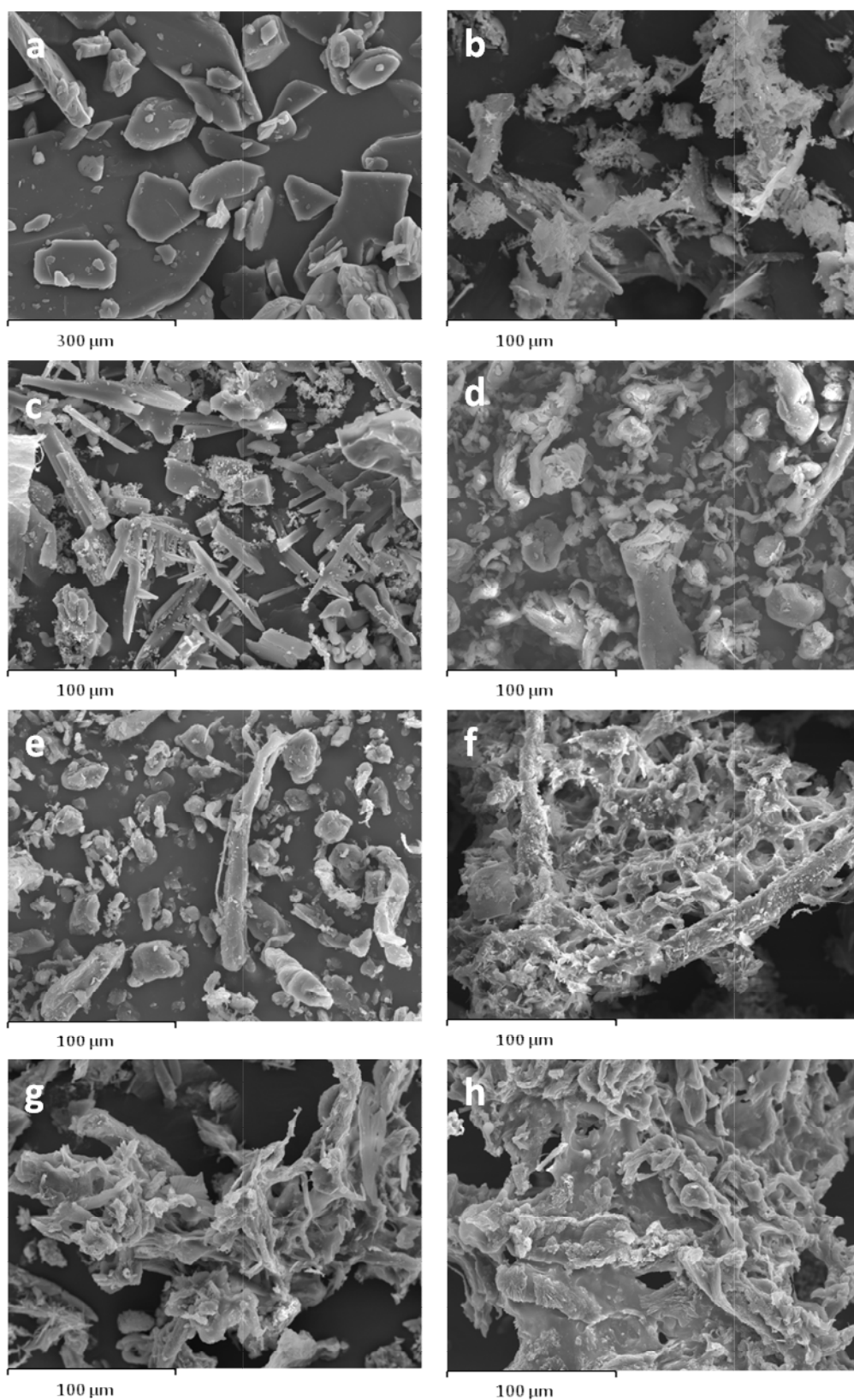


Figura 4.6: Microfotografías de las distintas formulaciones de IND elaboradas con solución tamponada de fosfato, a 500x. IND materia prima (a); DS-1:0,12:0 (b); DS-0:0,12:0 (c); MF-1:0,12:20 (d); L-HPC (e); DS-1:0,12:5 (f); DS-1:0,12:10 (g); DS-1:0,12:20 (h).

La morfología original de todos los componentes desapareció en las DS, mientras que la DS-1:0,12:0 (Figura 4.6.b) observada a los mismos aumentos (500 ×) mostró formas cristalinas similares a la IND (Figura 4.6.a). Esta DS-1:0,12:0 presentaba cristales finos que cubrían su superficie, que pueden generarse debido al proceso de liofilización.

La DS-0:0,12:0 presentaba cristales aciculares de LSS y los componentes de tampón fosfato (Figura 4.6.c).

En una comparación de la MF-1:0,12:20 (Figura 4.6.d) y la DS-1:0,12:20 (Figura 4.6.h), las partículas lisas de L-HPC (Figura 4.6.e) podrían distinguirse fácilmente de los cristales heterogéneos con bordes, posiblemente relacionados con IND, en la mezcla física, pero no en la DS. En contraste, las DS con diferentes cargas de L-HPC (DS-1:0,12:5; DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20) se parecían a la matriz (Figura 4.6.f, 4.6.g y 4.6.h). En estas DS de L-HPC, cuanto mayor es la carga de L-HPC, menor es la porosidad de la matriz. Estos resultados demostraron que la IND se dispersó homogéneamente en la matriz de L-HPC de las DS, donde posiblemente podría existir en forma amorfa (Yamashita, et al., 2003).

Por otro lado, las dispersiones sólidas (DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20) presentaron diferentes partículas con un aspecto claramente diferente (Figura 4.6.f, 4.6.g y 4.6.h).

4.3.4. XRPD

La figura 4.7 muestra los patrones de difracción de rayos X de IND materia prima, DS-0:0,12:0; DS-1:0,12:0, DS-1:0,12:5; DS-1:0,12:10, DS-1:0,12:20, MF-1:0,12:5, MF-1:0,12:20 y L-HPC.

La IND materia prima presentó picos de baja intensidad, típicos de una sustancia con baja cristalinidad (Figura 4.7.a). La estructura cristalina del fármaco puro con picos de baja intensidad en ángulos de 11,6°, 17,2°, 19,5°, 21,6° y 29,3° (2θ) coincide con el polimorfo γ (Semjonov et al., 2016).

Esta baja cristalinidad del fármaco puede estar relacionada con la forma heterogénea de sus cristales con bordes y diferentes tamaños observados en estudios de SEM.

La hidroxipropilcelulosa (HPC) es un polímero semicristalino con dominios amorfos y cristalinos (Saeedi, et al., 2011; Sarode, et al., 2014). El patrón de rayos X de la L-HPC exhibió un patrón de difracción característico de halo semicristalino con valores de baja intensidad similares a la IND entre $19,8^\circ$ y $28,4^\circ$ (2θ), y una intensidad de difracción mayoritaria a $20,1^\circ$ (2θ) (Kiyose, et al., 2007).

Solamente el ácido bórico (usado en el tampón fosfato de pH 8,4), tenía una estructura cristalina, con picos de difracción con ángulos de $14,7^\circ$; $27,7^\circ$; $32,29^\circ$ y $40,3^\circ$ (2θ) (Figura 4.8.a), mientras que el SDS y los otros excipientes no tenían picos característicos de las sustancias cristalinas (Figura 4.8.b).

En ambas mezclas físicas (MF-1:0,12:5 y MF-1:0,12:20) los picos de difracción de la IND aún se pueden ver en ángulos de difracción de $19,5^\circ$ y $21,6^\circ$ (2θ) (ver figura 4.7.a y 4.7.b). La intensidad de los picos disminuye con cantidades crecientes de L-HPC en la mezcla física (MF-1:0,12:20).

Se pudo observar una reducción en la cristalinidad del fármaco de casi el 55% en la MF-1:0,12:5 y la cristalinidad de IND disminuyó en aproximadamente el 88% en la mezcla física con la mayor cantidad de L-HPC (MF-1:0,12:20). Este resultado puede atribuirse al efecto de dilución ocasionado por las grandes cantidades de L-HPC.

Como se esperaba, la MF-1:0,12:20 mostró picos de intensidad más altos coincidiendo con el halo semicristalino de la matriz (entre $19,8^\circ$ y $28,4^\circ$ (2θ)).

Las altas cantidades de L-HPC en esta mezcla física justificaron la presencia de este halo (Figura 4.7.h).

Además, la DS-1:0,12:0 (Figura 4.7.d) mostró prácticamente los mismos picos a $15,9^\circ$; $28,3^\circ$; $32,3^\circ$ y $40,4^\circ$ (2θ), relacionados con el ácido bórico, componente del tampón de pH 8,4. Los picos de difracción de la IND no se observaron en esta muestra. La ausencia de cristalinidad en el fármaco en esta formulación podría estar causada por el proceso de liofilización (Pralhad et al., 2004). Esta disminución en la cristalinidad después del proceso de liofilización podría estar relacionada con mejoras en los perfiles de disolución, como se observa en los ensayos de disolución.

Las DS con diferentes proporciones de L-HPC presentan un resultado similar a DS-1:0,12:0 (Figura 4.7.d) y no muestran ninguno de los picos atribuidos a la IND.

Las formulaciones, DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20, (Figura 4.7.e, Figura 4.7.f y Figura 4.7.g) presentaron el patrón de difracción de halo semicristalino de L-HPC, con menor intensidad a $20,1^\circ$ (2θ). Este hecho confirmaría que el proceso de liofilización disminuye la cristalinidad en estas formulaciones.

La escasa sensibilidad del método de Difracción de rayos X también dificulta la determinación de los picos de cristalinidad de las muestras con valores de baja intensidad, como la IND. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (García-Rodríguez, 2011). Los estudios de DSC serán necesarios para completar estos estudios sobre la disminución de la cristalinidad.

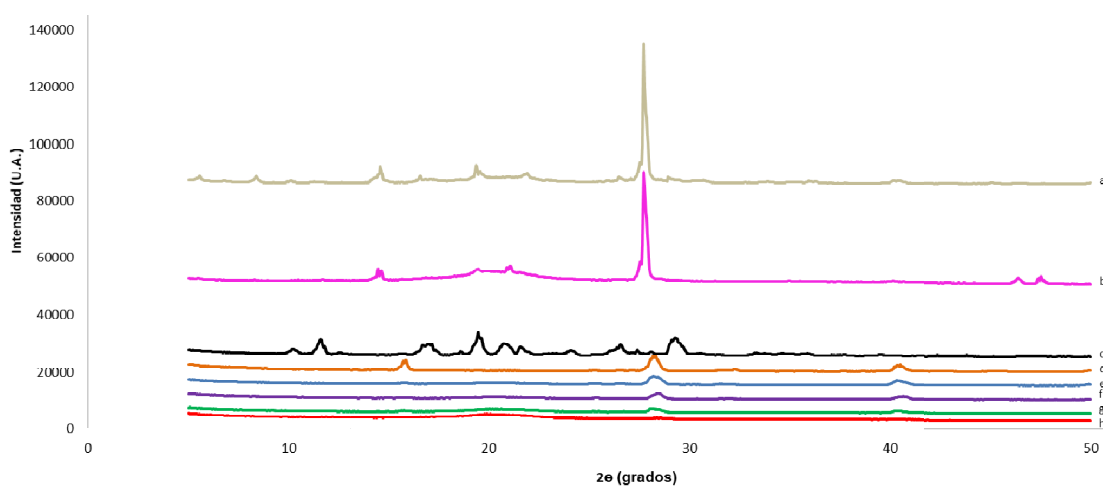


Figura 4.7: difractogramas de las diferentes formulaciones de IND: MF-1:0,12:5 (a); MF-1:0,12:20 (b); IND materia prima (c); DS-1:0,12:0 (d); DS-1:0,12:5 (e); DS-1:0,12:10 (f); DS-1:0,12:20 (g); L-HPC (h).

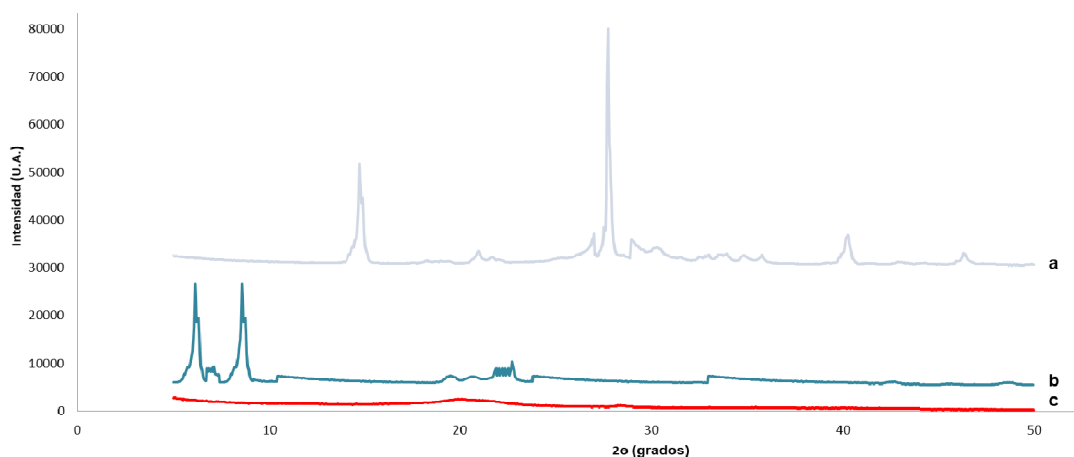


Figura 4.8: difractogramas de los diferentes excipientes de las formulaciones de IND: ácido bórico (a); SDS (b); L-HPC (c).

4.3.5. DSC

La figura 4.9 muestra los termogramas IND materia prima; DS-1:0,12:0, DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10, DS-1:0,12:20, MF-1:0,12:20 y L-HPC. La IND materia prima (Figura 4.9.a) presenta un pico endotérmico a 160,99 ° C con baja cristalinidad (116,05 J / g) (Rojas-Oviedo, et al., 2012).

Por otro lado, la MF-1:0,12:20 (Figura 4.9.b) mostró un un pequeño pico endotérmico para L-HPC a 158,31 ° C (inicio 157,14 ° C); La baja entalpía de fusión de este pico (52,34 mJ / g) se relacionó con su estructura semicristalina (Palmeiro-Roldán, et al., 2014).

Entre los otros excipientes de la formulación, solo el ácido bórico, usado en el tampón de pH 8,4, tenía una estructura cristalina con dos picos endotérmicos a 167,22 ° C (menor) y 170,31 ° C (mayor), además de cambios característicos en la línea de base a mayores temperaturas (Figura 4.10.c); mientras que el SDS y los otros excipientes no tenían picos endotérmicos característicos de las sustancias cristalinas (Figura 4.10.a).

En el espectro calorimétrico de la MF-1:0,12:20 se pueden diferenciar dos eventos térmicos (Figura 4.9.b), un pico menor a 144,84 ° C y un pico mayor a 168,22 ° C.

El pico de fusión de la IND en la curva para esta mezcla física experimentó un cambio a una temperatura más baja (144,84 °C), mientras que el pico de fusión

para la L-HPC y el ácido bórico se desplazó a una temperatura más alta (168,22 °C). Este descenso en el punto de fusión del fármaco es un efecto común en mezclas de componentes múltiples y se considera una interacción positiva con la L-HPC y otros excipientes cristalinos de la formulación (Gómez-Burgaz, et al., 2009; Löbmann, et al., 2017; Bannow, et al., 2017).

El pico más agudo observado a 168,22 °C en la MF-1:0,12:20 se puede atribuir a una combinación de dos de los componentes en la formulación: el primero es la L-HPC, que puede haber cambiado a temperaturas más altas (pasando de 158,31 °C a 168,22 °C) (Palmeiro-Roldán, et al., 2014) y el segundo pico más agudo corresponde con el ácido bórico, una sustancia altamente cristalina utilizada en el tampón.

La presencia de altas cantidades de L-HPC produce un solo pico endotérmico a 168 °C donde se incluye el ácido bórico. Un proceso similar de inclusión en un solo pico ha sido observado por diferentes autores (Pani, et al., 2012).

En contraste, en el termograma DS-1:0,12:0 (Figura 4.9.c), sólo se observó un ligero halo amorfo entre 154-166 °C, que puede estar relacionado con una disminución en la cristalinidad de la IND, posiblemente debido al proceso de liofilización. No se observaron picos atribuidos a los componentes del tampón en esta muestra liofilizada.

Las dispersiones sólidas IND:LSS:L-HPC (DS-1:0,12:5, DS-1:0,12:10 y DS-1:0,12:20) mostraron una ligera disminución de la cristalinidad y también un ensanchamiento en el halo amorfo (entre 123-158 °C para DS-1:0,12:5, 126-162 °C para DS-1:0,12:10 y 122-158 °C para DS-1:0,12:20 respectivamente (ver Figura 4.9.d, 4.9.e y 4.9.f). La aparición del halo amorfo de la IND disminuye a medida que aumenta la proporción de L-HPC en la muestra. Estos resultados confirman la existencia de una interacción positiva entre el IND y la L-HPC en muestras liofilizadas.

El carácter amorfo de la IND en las DS observadas en los estudios de DSC confirmó la hipótesis de los estudios de Difracción de rayos X de que se están formando especies amorfas de IND.

Las DS podrían modificar la cristalinidad del fármaco y representar una modificación adecuada para mejorar sus perfiles de disolución. Estos resultados también se confirmaron en los ensayos de disolución, donde se observaron mejoras en los perfiles de disolución de las diversas DS en comparación con la IND materia prima y la MF-1:0,12:20. Las sustancias amorfas generalmente tienen una mayor solubilidad y velocidad de disolución que sus correspondientes formas cristalinas termodinámicamente estables, ya que sus fuerzas de unión internas son débiles (Sun, et al., 2012).

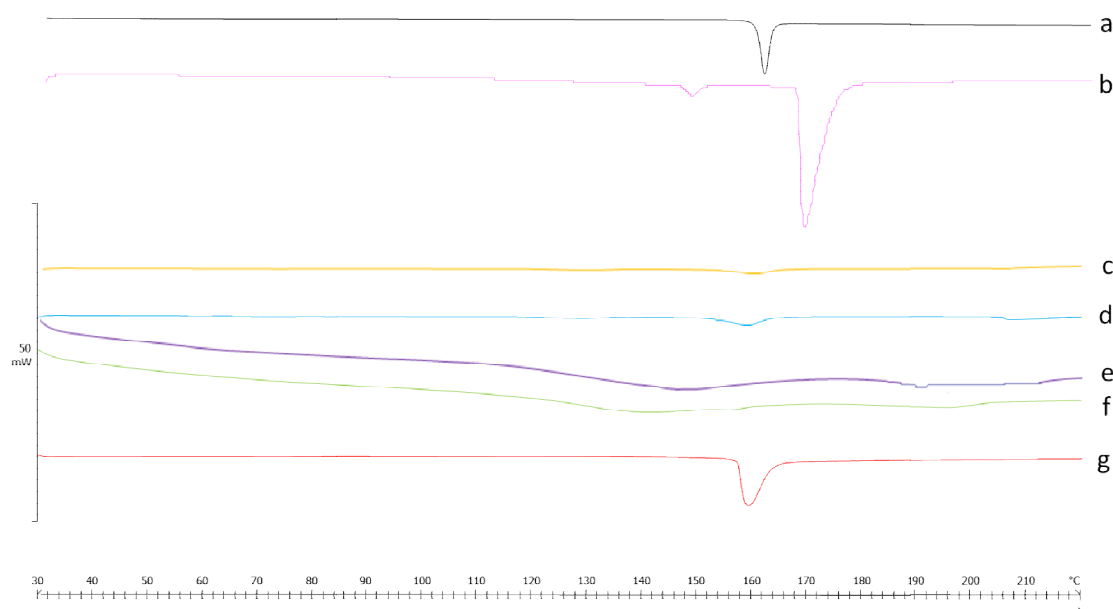


Figura 4.9: espectros calorimétricos de las diferentes formulaciones de IND: IND materia prima (a), MF-1:0,12:20 (b); DS-1:0,12:0 (c); DS-0,12:5 (d); DS-1:0,12:10 (e); DS-1:0,12:20 (f) y L-HPC (g).

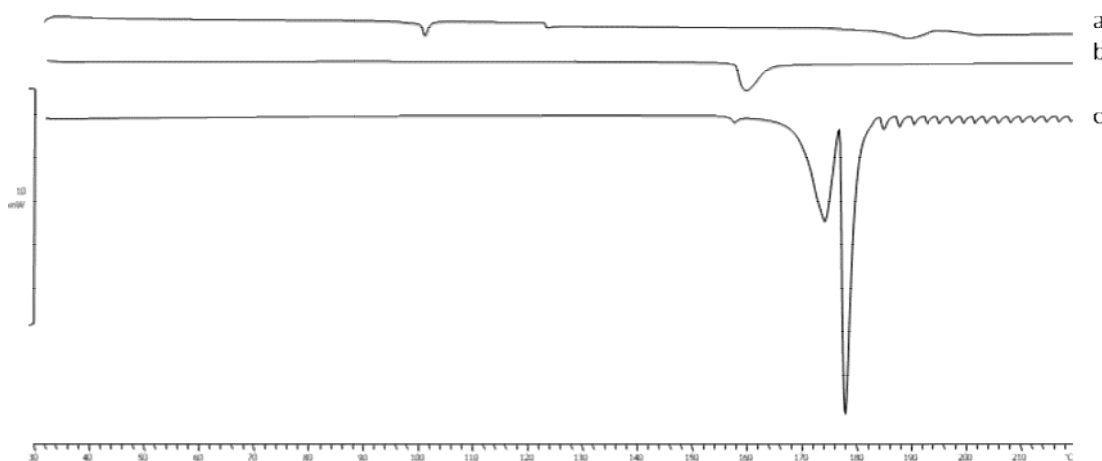


Figura 4.10: espectros calorimétricos de los diferentes excipientes de las formulaciones de IND: SDS(a), L-HPC (b); Ácido bórico (c).

4.4. Bibliografía

- Ambike, A.A., Mahadik, K.R. y Paradkar, A. (2004): "Stability study of amorphous valdecoxib", International Journal of Pharmaceutics, 282(1-2), pp. 151-162.
- Bannow J, Benjamins JW, Wohler J, Löbmann K, Svagan AJ. Solid nanofoams based on cellulose nanofibers and indomethacin-the effect of processing parameters and drug content on material structure. Int J Pharm 2017;526(1-2), pp. 291-9.
- Dahlberg. C., Millqvist-Fureby, A., Schuleit, M. y Furó, I. (2010): "Polymer-drug interactions and wetting of solid dispersions", European Journal of Pharmaceutical Sciences, 39(1-3), pp. 125-33.
- de la Torre-Iglesias, P.M., García-Rodríguez, J.J., Torrado-Durán, G., Torrado-Durán. S., Torrado-Santiago, S. y Bolás-Fernández, F. (2014): "Enhanced bioavailability and anthelmintic efficacy of mebendazole in redispersible microparticles with low-substituted hydroxypropylcellulose", Drug Design, Development and Therapy, 8, pp. 1467-1479.
- Dharmalingam K, Anandalakshmi R. (2019): "Fabrication, characterization and drug loading efficiency of citric acid crosslinked NaCMC-HPMC hydrogel films for wound healing drug delivery applications". Int J Biol Macromol, (134), pp. 815-829.

- El-Badry, M., Fetih, G. y Fathy, M. (2009): "Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG4000", Saudi Pharmaceutical Journal, 17(3), pp. 217-225.
- El-Sabawi, D., Hamdan, I.I. (2014): "Improvement of dissolution rate of gliclazide through sodium salt formation", Dissolution Technologies, 21(4), pp. 49-55.
- García-Herrero, V., Torrado, C., García-Rodríguez, J.J., López-Sánchez, A., Torrado, S. y Torrado-Santiago, S. (2017): "Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: *In vitro* and *in vivo* studies", International Journal of Pharmaceutics, 529(1-2), pp. 381-90.
- García-Rodríguez, J.J., de la Torre-Iglesias, P.M., Vegas-Sánchez, M.C., Torrado-Durán, S., Bolás-Fernández, F. y Torrado-Santiago, S. (2011): "Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: Improved anthelmintic activity", International Journal of Pharmaceutics, 403(1-2), pp. 23-28.
- Gómez-Burgaz, M., Torrado, G., Torrado y S. (2009): "Characterization and superficial transformations on mini-matrices made of interpolymers complexes of chitosan and carboxymethylcellulose during *in vitro* clarithromycin release", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 73(1), pp. 130-139.
- Kawabata, Y., Yamamoto, K., Debari, K., Onoue, S. y Yamada, S. (2010): "Novel crystalline solid dispersion of tranilast with high photostability and improved oral bioavailability", European Journal of Pharmaceutical Sciences, 39(4), pp. 256-262.
- Kiyose M, Yamamoto E, Yamane C, Midorikawa T, Takahashi T. Structure and Properties of Low-Substituted Hydroxypropylcellulose Films and Fibers Regenerated from Aqueous Sodium Hydroxide Solution. Polymer Journal 2007;39, pp. 703–11.
- Löbmann K, Wohler J, Müllertz A, Wågberg L, Svagan AJ. Indomethacin: Cellulose nanopaper and nanofoam for patient-tailored drug delivery. Adv Mater Interfaces 2017; 9(4).

- Oishi, T.S., Haque, M.A., Dewan, I. y Islam, S.M.A. (2011): “Comparative *in vitro* dissolution study of some ciprofloxacin generic tablets under biowaiver conditions by RP-HPLC”, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2(12), pp. 3129-3135.
- Palmeiro-Roldán R, Fonseca-Berzal C, Gómez-Barrio A, Arán VJ, Escario JA, Torrado-Durán S, Torrado-Santiago S. Development of novel benznidazole formulations: physicochemical characterization and *in vivo* evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. Int J Pharm 2014;472(1-2), pp. 110-117.
- Pani NR, Nath LK, Acharya S, Bhuniya B. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. J Therm Anal Calorim 2012;108, pp. 219–226.
- Pralhad, T. y Rajendrakumar, K. (2004): “Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34(2), pp. 333-339.
- Rojas-Oviedo, I., Retchkiman-Corona, B., Quirino-Barreda, C.T., Cárdenas, J. y Schabes-Retchkiman, PS. (2012): “Solubility enhancement of a poorly water soluble drug by forming solid dispersions using mechanochemical activation”, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 74(6), pp. 505-511.
- Saeedi, M., Akbari, J., Morteza-Semnani, K., Enayati-Fard, R., Sar-Reshteh-Dar, S. y Soleymani, A. (2011): “Enhancement of dissolution rate of indomethacin using liquisolid compacts”, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 10(1), pp. 25-34.
- Sarode, A.L., Malekar, S.A., Cote, C., Worthen, D.R. (2014): “Hydroxypropyl cellulose stabilizes amorphous solid dispersions of the poorly water soluble drug felodipine”. Carbohydr Polym, 112, pp. 512-519.
- Semjonov, K., Kogermann, K., Laidmäe, I., Antikainen, O., Strachan, C.J., Ehlers, H., Yliruusi, J. y Heinämäki, J. (2016): “The formation and physical stability of two-phase solid dispersion systems of indomethacin

in supercooled molten mixtures with different matrix formers”, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 97, pp. 237-46.

- Stuart, A.V., Zuo, J. y Löbenberg, R. (2014): “Investigating the dissolution profiles of amoxicillin, metronidazole, and zidovudine formulations used in Trinidad and Tobago, West Indies”, AAPS PharmSciTech, 15(5), pp. 1060-1069.
- Sun, Y., Zhu, L., Wu, T., Cai, T., Gunn, E.M. y Yu, L. (2012): “Stability of amorphous pharmaceutical solids: crystal growth mechanisms and effect of polymer additives”, The AAPS Journal, 14(3), pp. 380-388.
- Tantishaiyakul, V. y Kaewnopparat, N. (1999): “Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone K-30”, International Journal of Pharmaceutics, 181(2), pp. 143-51.
- USP 42 (United States Pharmacopoeia 42). 2019.
- Yamashita, K., Nakate, T., Okimoto, K., Ohike, A., Tokunaga, Y., Ibuki, R., Higaki, K., Kimura, T. (2003): “Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus” Int J Pharm, 267(1-2), pp. 79-91.

DISPERSIONES SÓLIDAS DE IND
FORMADAS EN AGUA
ALCALINIZADA CON NaOH

5. Dispersiones sólidas de IND elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.

5.1. Introducción

El principal objetivo de este capítulo es elaborar diferentes DS de IND que aumenten la solubilidad de este principio activo, mejorando el método de elaboración de las dispersiones sólidas mediante la reducción de sales en el medio formador de las dispersiones sólidas, que puedan interferir con el proceso de liofilización (Garidel, et al., 2015).

Con el fin de obtener dispersiones sólidas de IND, se ha utilizado como matriz hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC) y como tensioactivo LSS.

A continuación, se desarrolló el proceso de elaboración de dispersiones sólidas de IND mediante liofilización.

Para realizar la caracterización de las formulaciones preparadas en el paso anterior, se llevaron a cabo estudios de determinación del ángulo de contacto, estudios de velocidad de disolución, SEM, XRPD, DSC y estudios de farmacocinética en ratas.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Materiales

Se ha agrupado el material en: materias primas, reactivos, soluciones e instrumental.

Materias primas

- IND (en adelante IND). Fagron Iberica[®] SAU, España.
- Lauril sulfato sódico (LSS). Fischer Scientific[®], Inglaterra.
- Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (en adelante L-HPC). Shin-Etsu[®], Tokio, Japón.

Reactivos

- Ácido acético glacial. Calidad PRS- Codex. Panreac Química[®] S.A., España.
- Acetato sódico PRS. Panreac Química[®] S.A., España.
- Dihidrógeno fosfato de potasio PRS. Panreac Química[®] S.A., España.
- Hidróxido sódico PRS. Panreac Química[®] S.A., España.

Soluciones

- Agua desionizada obtenida por un sistema Milli-Q[®] (Millipore[®], Estados Unidos).
- Disolución ácido clorhídrico 0,1 N (pH 1,2) según la USP 42: se añaden 8,3 ml de una disolución de ácido clorhídrico al 37% en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Disolución normalizada de ácido acético 2 N según la USP 42: se añaden 116 ml de ácido acético glacial en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 4,5 según la USP 42: se añaden 2,99 g de acetato sódico trihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en un matraz aforado de 1000 ml, a continuación 14 ml de ácido acético 2N y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 6,8 según la USP 42: se añaden 50 ml de una disolución de fosfato potásico monobásico 0,2 M y 22,4 ml de una disolución de hidróxido sódico 0,2 M en un matraz aforado de 200 ml y se enrasa con agua destilada.
- Solución de NaOH 0,2 M.

Instrumental

- Agitador magnético-calefactor (Velp[®] científicar, Alemania).
- Balanza Mettler AG 104 (Mettler-Toledo[®] GmbH, Suiza).
- Equipo de liofilización: Telstar LyoQuest[®] (Tarrasa, España).
- pHmetro Mettler Toledo MP230 (Mettler-Toledo[®] GmbH, Suiza).
- Congelador Liebherr GT 2121 (Liebherr[®], Alemania).
- Baño de agitación Memmert Wbath-001 (Fisher Scientific[®], Estados Unidos).

5.2.2. Métodos

Al igual que en el caso anterior, las dispersiones sólidas de IND se elaboraron por el método de liofilización utilizando L-HPC como matriz. Se seleccionó la proporción de IND:LSS que presentaba un mejor perfil de velocidad de disolución, se prepararon dispersiones sólidas con proporciones, IND:LSS:L-HPC 1:0,12:0; 1:0,12:5 y 1:0,12:20 (p/p). Las cantidades correspondientes de IND y L-HPC se disolvieron en 20 ml de agua alcalinizada (pH 8,4) con una solución de NaOH 0,2 M y con una concentración de 0,125 mg/ml de LSS.

Después, las muestras se congelaron a -40°C durante al menos 24 h y a continuación se liofilizaron.

Después del proceso de liofilización, cada una de las diferentes formulaciones fue molida y tamizada para obtener un tamaño de partícula de 0,125–0,500 mm (de la Torre-Iglesias et al., 2014). Transcurridos 5 minutos después de este proceso, los viales se taparon y almacenaron en un desecador con silicagel a temperatura ambiente ($22\text{--}24^{\circ}\text{C}$).

La mezcla física (MF) IND:LSS:L-HPC 1:0,12:20 (p/p) se preparó mezclando manualmente las correspondientes cantidades de IND y vehículo polimérico con un tamaño de partícula de 0,125–0,500 mm, en un mortero de cerámica utilizando una espátula polimérica. La DS-0:0,12:0 se elaboró siguiendo el método descrito anteriormente, pero sin IND.

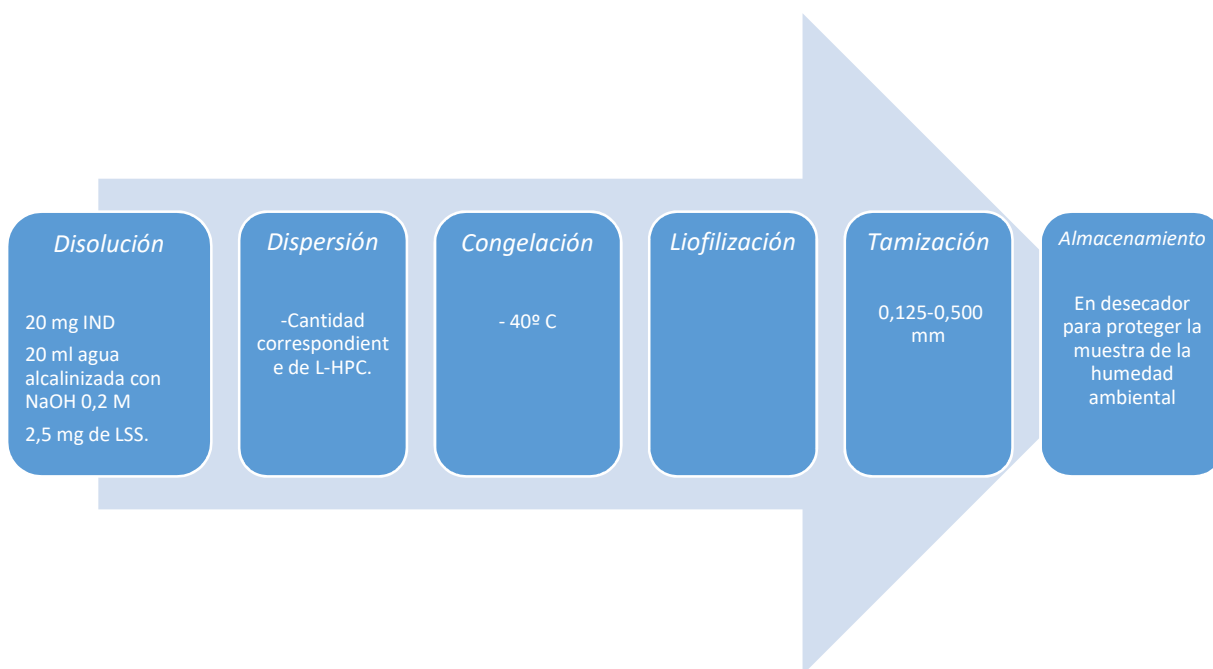


Figura 5.1: Proceso de elaboración de las formulaciones preparadas en medio alcalinizado con hidróxido sódico.

Ángulo de contacto.

Ver apartado 3 de esta tesis, “Materiales y Métodos”.

Velocidad de disolución.

Ver apartado 3 de esta tesis, “Materiales y Métodos”.

Microscopía electrónica de barrido (SEM), Difracción de rayos X (XRD) y Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Ver apartado 3 de esta tesis, “Materiales y Métodos”.

Estudios in vivo de biodisponibilidad tras la administración oral

Ver apartado 3 de esta tesis, “Materiales y Métodos”.

Análisis estadístico de datos

Los resultados obtenidos de los ensayos de disolución de las diferentes formulaciones se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la diferencia estadística mínima de Fisher (LSD) para comparaciones múltiples. Un valor de P inferior a 0,05 se consideró significativo.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Ángulo de contacto

Las mediciones del ángulo de contacto con agua desionizada se realizaron sobre muestras comprimidas (ver apartado 3 de esta tesis, “Materiales y Métodos”) de las diferentes dispersiones sólidas (DS-1:0,12:0-NaOH; DS-1:0,12:5-NaOH y DS-1:0,12:20-NaOH), de mezcla física (MF-1: 0,12: 20-NaOH) y de IND materia prima.

Se sabe que la rugosidad de la superficie y el posible hinchamiento del polímero pueden influir en el comportamiento de humectación (Dahlberg et al., 2010). Como puede verse en la figura 5.2 el ángulo de contacto del agua en los comprimidos se fue reduciendo gradualmente a medida que pasaba el tiempo de 1s a 4s.

El ángulo de contacto del agua en los comprimidos de IND fue el más alto ($107 \pm 2^\circ$ después de 1 s) de todas las muestras estudiadas, lo que se atribuyó a la mayor hidrofobicidad de este fármaco (ver apartado 4 de esta tesis “Formulaciones de IND elaboradas en una solución tamponada de fosfato”). Dahlberg, et al., 2010.

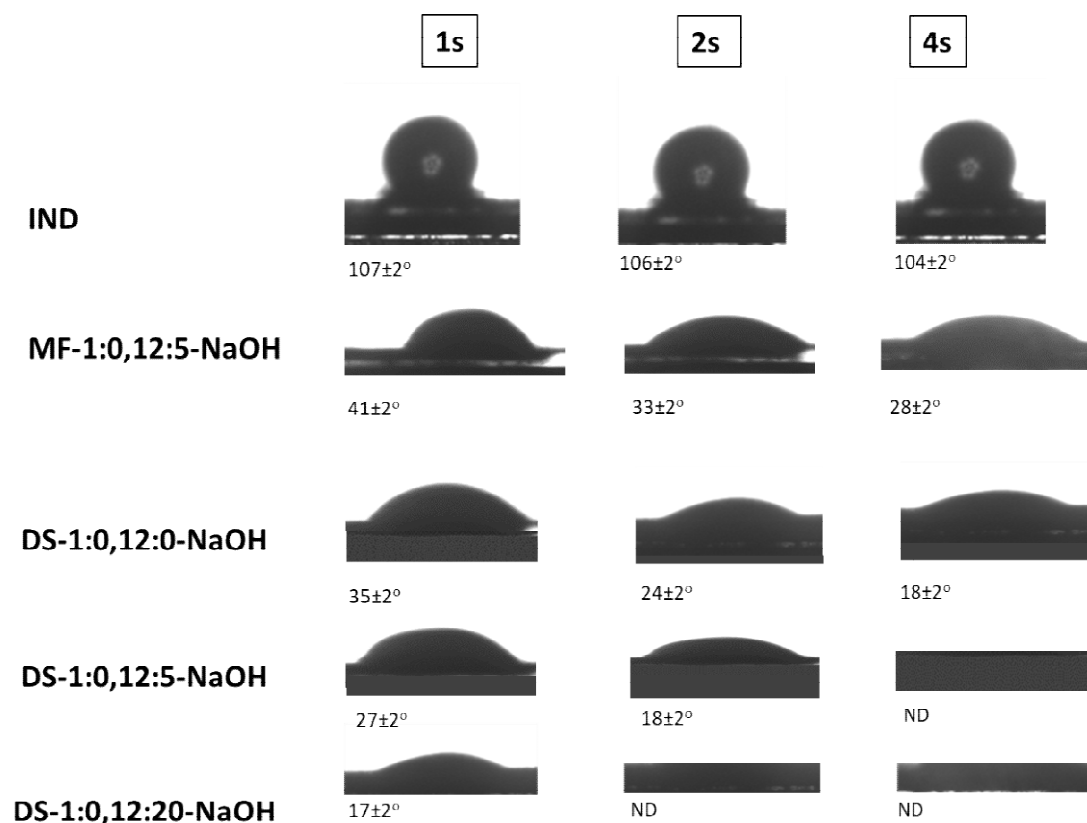


Figura 5.2: Ángulo de contacto del agua sobre las diferentes formulaciones de IND.

Por otro lado, la mezcla física obtuvo valores de ángulo de contacto mucho más pequeños ($41 \pm 2^\circ$ después de 1 s), probablemente debido a su composición (L-HPC y LSS) que aumentan su humectabilidad.

La DS-1:0,12:20-NaOH presentó el ángulo de contacto más pequeño ($17 \pm 2^\circ$ después de 1 s), mucho más pequeño que la mezcla física con la misma relación IND: L-HPC, lo que puede deberse a un aumento en la humectabilidad de la formulación, después del proceso de liofilización. (Dharmalingam y Anandalakshmi, 2019).

Además, se observa que la dispersión sólida sin matriz, DS-1:0,12:0-NaOH tiene un ángulo de contacto mayor que la DS-1:0,12:5-NaOH, una diferencia que aumenta con el aumento de la carga de L-HPC en la formulación (DS - 1:0,12:20-NaOH), esto podría deberse a un aumento en la humectabilidad, debido a la L-HPC (Dahlberg, et al., 2010).

En vista de estos resultados, se podría concluir que existe una gran influencia del L-HPC en la humectabilidad de las muestras.

Comparación de las formulaciones de IND elaboradas en medio tampón fosfato con las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.

Como se ha observado, las formulaciones elaboradas con NaOH, no presentan diferencias significativas ($P>0,05$) respecto a las formulaciones con las mismas cantidades de L-HPC elaboradas con tampón pH 8,4, por tanto se puede concluir que la humectabilidad de las formulaciones es independiente del método de elaboración. Resultados similares han sido obtenidos por Dahlberg, et al., 2010, quienes observaron también, como el ángulo de contacto disminuía al incorporar polímeros de celulosa a fármacos hidrófobos.

5.3.2. Ensayos de velocidad de disolución

A pH 1,2 (medio gástrico simulado) la MF-1:0,12:20-NaOH, mostró un perfil de disolución similar al del principio activo a ese mismo pH, no observándose diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) entre ellas (Figura 5.3).

Al igual que ocurrió en el caso de las DS elaboradas con tampón fosfato, todas las DS preparadas con una solución acuosa alcalina mejoraron significativamente la velocidad de disolución de la IND a pH 1,2, obteniéndose cantidades disueltas de fármaco comprendidas entre $14,03 \pm 0,41\%$ y $15,53 \pm 0,32\%$ a los 120 min, y entre $20,5 \pm 0,54\%$ y $24,42 \pm 0,93\%$ a las 24 h, siendo los porcentajes más bajos obtenidos a partir de la DS-1:0,12:0-NaOH y los más altos con la DS-1:0,12:20-NaOH, sin observarse diferencias significativas ($P>0,05$) entre las distintas DS.

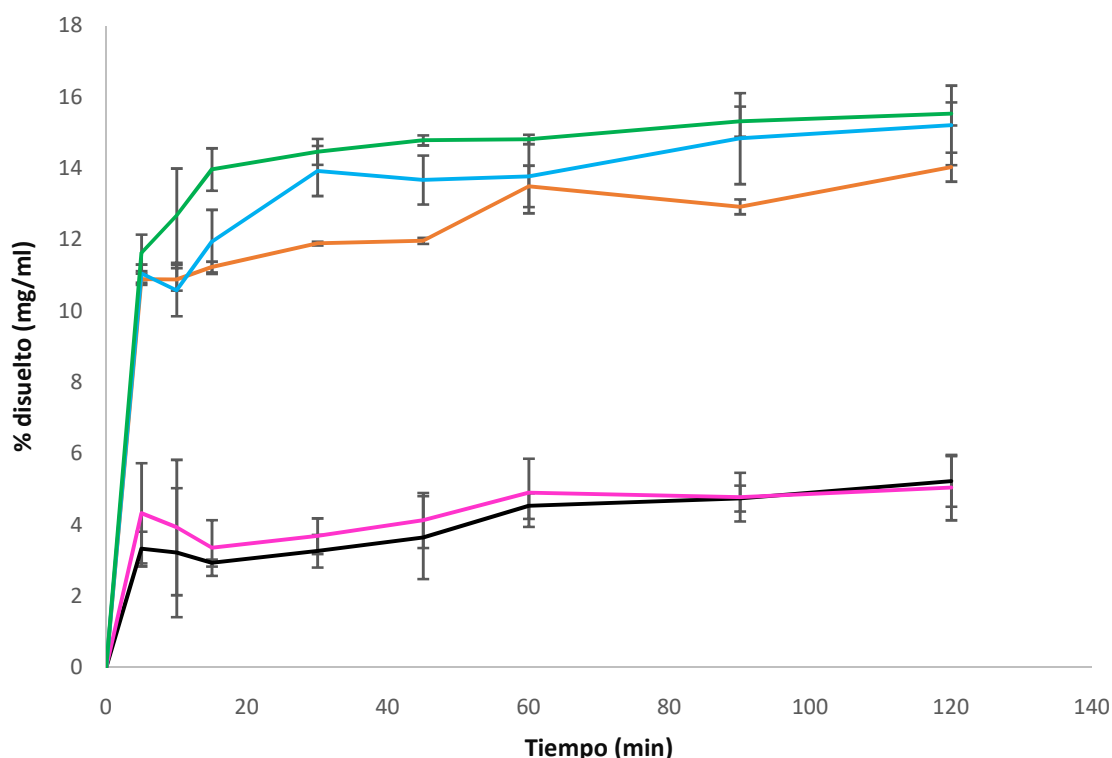


Figura 5.3: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 1,2. — IND materia prima, — MF-1:0,12:20-NaOH; — DS-1:0,12:0-NaOH; — DS-1:0,12:5-NaOH; — DS-0,12:20-NaOH.

En la figura 5.4 se pueden observar los perfiles de disolución de la IND materia prima, la MF-1:0,12:20-NaOH y las diferentes DS en un medio de pH 6,8 (medio intestinal). Tal y como se observó en los estudios de velocidad de disolución de las formulaciones elaboradas con tampón fosfato pH 8,4, la IND materia prima y la MF-1:0,12:20-NaOH mostraron los peores perfiles de disolución, presentando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los porcentajes disueltos de fármaco a los 5 minutos ($25,23 \pm 3,05\%$ y $33,51 \pm 1,14\%$, respectivamente). Sin embargo a los 120 min no se observan diferencias estadísticamente significativas entre la IND materia prima ($76,56 \pm 5,60\%$) y la MF-1: 0,12:20 ($79,53 \pm 1,81\%$) ($P > 0,05$).

A este pH, a diferencia de lo que ocurría con las formulaciones elaboradas con tampón fosfato, las DS con mayores cantidades de L-HPC (DS-1:0,12:5-NaOH y DS-1:0,12:20-NaOH) no presentaron un aumento significativo ($P > 0,05$) en la cantidad de fármaco disuelta a los 5 min ($85,54 \pm 0,06$ y $84,46 \pm 1,61\%$, respectivamente) en comparación con la DS sin L-HPC (DS-1:0,12:0-NaOH) que presenta un porcentaje de IND disuelto del $83,92 \pm 1,09\%$. Esto puede ser

debido a la ausencia de las sales que componen la solución tamponada de fosfato, que como ya han comprobado otros autores, disminuyen la solubilidad de algunos fármacos sometidos a procesos de liofilización, debido a su densa estructura y el alto contenido en sólidos, los poros que se forman tras la liofilización son muy pequeños y limitan la velocidad con la que el agua de reconstitución llega a los poros, retrasando así el proceso de rehidratación. (Garidel, et al., 2015).

Al igual que ocurría con las formulaciones elaboradas con tampón fosfato pH 8,4, a este pH (6,8), todas las DS presentan porcentajes de sustancia activa disuelta muy elevados y por lo tanto, en este medio, no es posible observar diferencias significativas ($P>0,05$) entre los perfiles de disolución de las diferentes DS.

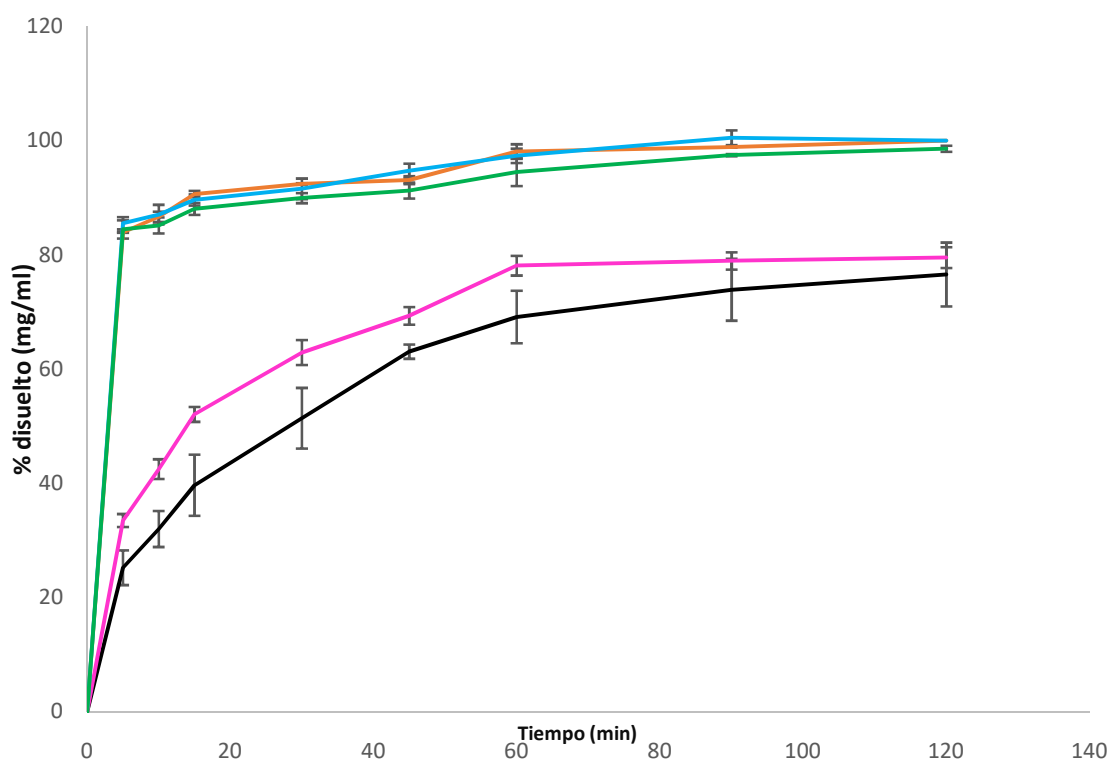


Figura 5.4: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 6,8. — IND materia prima — DS:1:0,12:20-NaOH; — DS:1:0,12:0-NaOH; — DS:1:0,12:5-NaOH; — DS:0,12:20-NaOH.

Con el propósito de lograr perfiles de disolución más lentos que permitan observar diferencias en los perfiles de disolución entre las diferentes

formulaciones, los ensayos de disolución se realizaron también a pH 4,5 (Figura 5.5).

En esta figura se pueden observar los perfiles de disolución de IND materia prima, la mezcla física 1:20 (MF-1:0,12:20-NaOH) y las diferentes DS con L-HPC (DS-1:0,12:0-NaOH; DS-1: 0,12:5-NaOH, y DS-1:0,12:20-NaOH) a este pH, cercano al pH del medio duodenal.

Como ocurrió con las formulaciones elaboradas con tampón fosfato, a pH 4,5, la IND materia prima y MF-1: 0,12:20-NaOH mostraron los porcentajes de fármaco disueltos más bajos. Las cantidades de IND disuelta desde el fármaco puro y a partir de la MF-1:0,12:20-NaOH a los 120 minutos fueron del $7,06 \pm 0,46$ y $12,45 \pm 1,34\%$ respectivamente.

Mientras que a las 24 horas, las cantidades de IND disuelta a partir de la IND materia prima y de la MF-1: 0,12:20-NaOH fueron $23,07 \pm 2,33\%$ y $23,53 \pm 0,15\%$, respectivamente. La mezcla física mejora significativamente ($P<0,05$) su perfil de disolución en comparación con la IND materia prima a los 120 minutos ($12,45 \pm 1,34\%$ y $7,06 \pm 0,46\%$, respectivamente).

Los perfiles de disolución del fármaco puro y de la MF-1:0,12:20-NaOH fueron mejorados significativamente ($P<0,05$) por todas las dispersiones sólidas, como ocurrió a pH 6,8 y con las DS elaboradas con tampón fosfato. Las DS alcanzaron antes el 100% disuelto de fármaco que la IND materia prima y que la MF-1:0,12:20-NaOH, alcanzando la DS-1:0,12:0-NaOH el $51,15 \pm 2,27\%$; la DS-1:0,12:5-NaOH y la DS-1:0,12:20-NaOH el $78,60 \pm 3,38\%$ y el $80,71 \pm 1,77\%$ a los 120 min.

Tal y como sucedió a pH 6,8, la DS-1:0,12:0-NaOH mejora significativamente el perfil de disolución de la IND pura y las propiedades de disolución de la MF-1:0,12:20-NaOH, presentando una cantidad de fármaco disuelta de $51,15 \pm 2,27\%$ a los 120 min.

En vista de estos resultados, se puede concluir que las DS con mayores cantidades de L-HPC aumentan significativamente ($P<0,05$) la cantidad disuelta de IND. Así, a los 5 minutos las cantidades de sustancia activa disuelta

desde la DS-1:0,12:0-NaOH, DS-1:0,12:5-NaOH y DS-1:0,12:20-NaOH fueron $35,32 \pm 12,38\%$; $64,28 \pm 0,87\%$ y $67,58 \pm 4,51$,

Por otra parte, la adición de bajas cantidades de L-HPC a las DS logra incrementos significativos ($P < 0,05$) en los porcentajes de IND disueltos a los 120 minutos ($51,15 \pm 2,27$ de DS-1:0,12:0 y $78,60 \pm 3,38$ de DS-1:0,12:5 respectivamente).

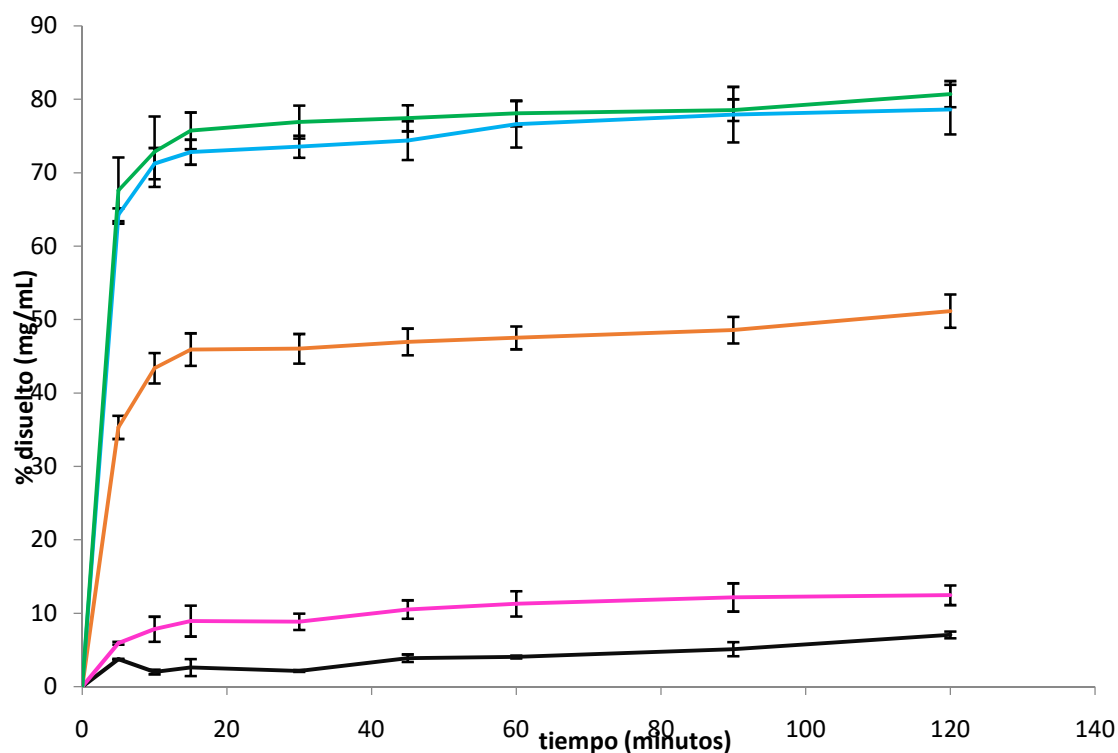


Figura 5.5: Perfiles de disolución de las diferentes formulaciones de IND a 37°C a pH 4,5. — IND material prima, — MF-1:0,12:20-NaOH; — DS-1:0,12:0-NaOH; — DS-1:0,12:5-NaOH; — DS-1:0,12:20-NaOH.

Comparación de las formulaciones de IND elaboradas en medio alcalinizado de fosfato con las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.

Con el objetivo de elegir la DS que presentase un mejor perfil de disolución, para realizar los estudios *in vivo* se llevó a cabo una comparación de todas las DS elaboradas con tampón fosfato y las elaboradas con agua alcalinizada con NaOH 0,2 N.

Para realizarla se eligió el pH 4,5, ya que como hemos explicado anteriormente, este pH nos permite comparar los diferentes perfiles de disolución de las distintas formulaciones de IND, observando diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) entre las diferentes DS, probablemente debido a la menor solubilidad del fármaco a pH 4,5 ya que está próximo su pKa (4,5) (Liu et al., 2013).

Como se puede observar en la figura 5.6, la MF-1:0,12:20 mejora significativamente el perfil de disolución de la MF-1:0,12:20-NaOH a los 120 min.

En este caso, al no intervenir el proceso de liofilización en la elaboración de las mezclas físicas, no se producen estructuras porosas y por tanto no va a influir en el proceso de elaboración como ocurría en las DS. El hecho de que la velocidad de disolución de la MF elaborada en solución tamponada de fosfato sea significativamente superior ($P<0,05$) a la MF elaborada con agua alcalinizada con NaOH, se explica debido a que el tampón fosfato mantiene el pH al que la IND es soluble, alrededor de las partículas que forman la mezcla física, mientras que el agua alcalinizada con NaOH no mantiene este pH.

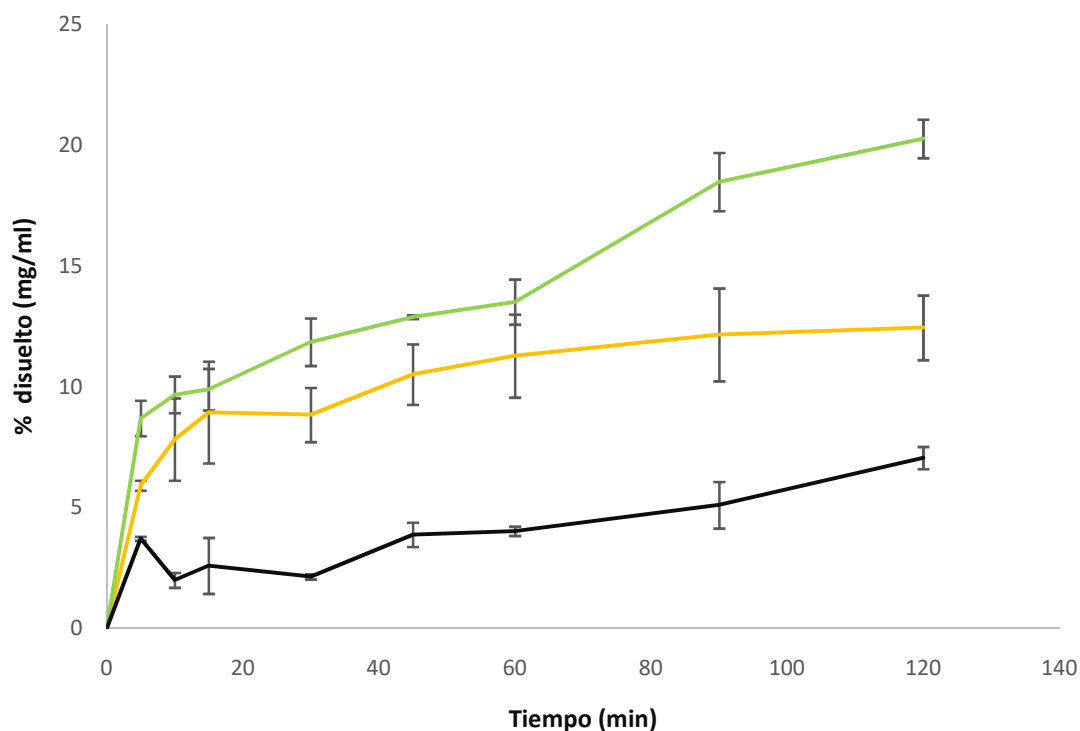


Figura 5.6: Perfiles de disolución de la MF-1:0,12:20 y la MF-1:0,12:20-NaOH en comparación con la IND a 37°C a pH 4,5. — IND materia prima; — MF-1:0,12:20; — MF-1:0,12:20-NaOH.

En la figura 5.7 se observa como la DS-1:0,12:0 presenta una mejora significativa ($P<0,05$) respecto a la IND materia prima, pero esta diferencia significativa ($P<0,05$) es mucho más notable con la DS-1:0,12:0-NaOH. (Garidel, et al., 2015).

Asimismo, esta última DS incrementa significativamente ($P<0,05$) la cantidad disuelta de fármaco a los 120 minutos, respecto a la DS con la misma proporción IND:LSS:L-HPC elaborada con tampón fosfato.

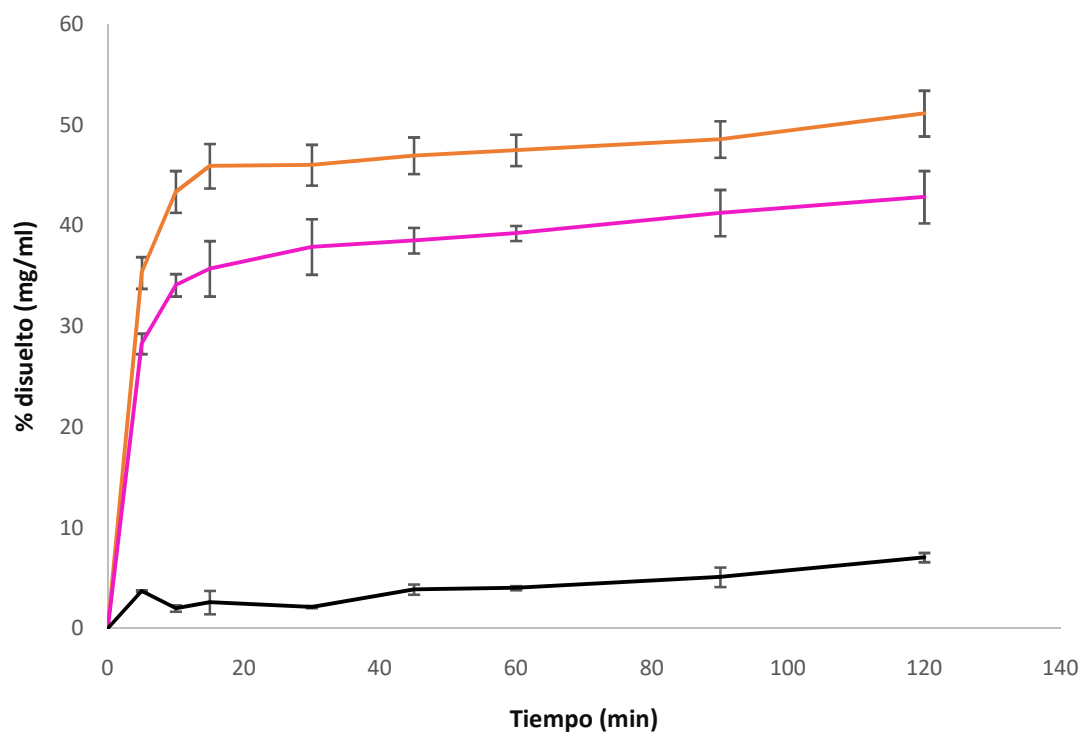


Figura 5.7: Perfiles de disolución de la DS-1:0,12:0 y la DS-1:0,12:0-NaOH en comparación con la IND a 37°C a pH 4,5. — IND materia prima; — DS-1:0,12:0; — DS-1:0,12:0-NaOH.

Por otra parte, la DS-1:0,12:5 mejora significativamente ($P<0,05$) la velocidad de disolución de la DS con la misma proporción IND:LSS:L-HPC elaborada con tampón fosfato, (Figura 5.8).

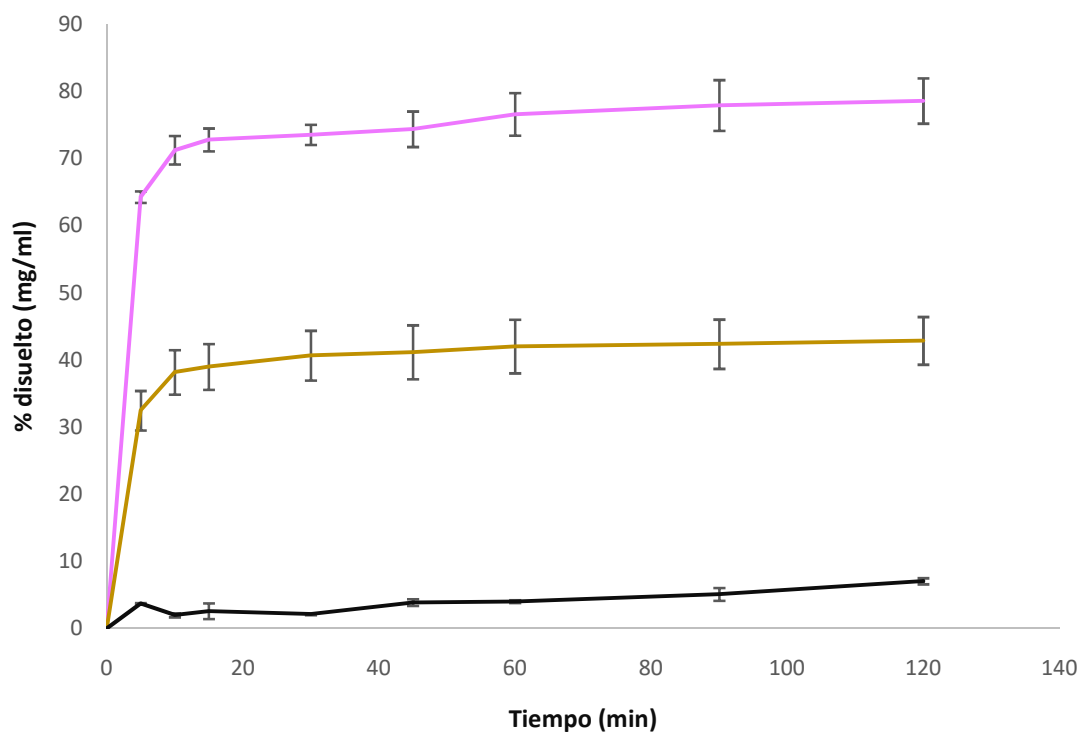


Figura 5.8: Perfiles de disolución de la DS-1:0,12:5 y la DS-1:0,12:5-NaOH en comparación con la IND a 37°C a pH 4,5. — IND materia prima; — DS-1:0,12:0; — DS-1:0,12:0-NaOH.

Por último, se observa en la figura 5.9 el incremento significativo en la cantidad de sustancia activa disuelta con la DS-0,12:20-NaOH en comparación con la DS-1:0,12:20.

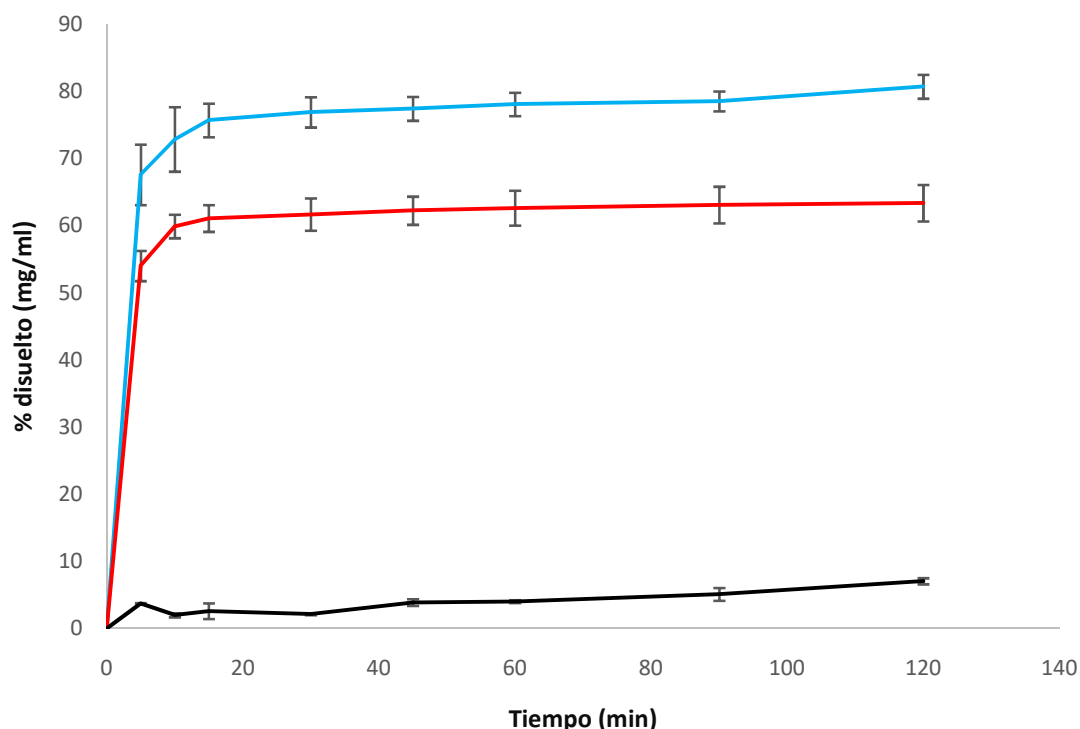


Figura 5.9: Perfiles de disolución de la DS-1:0,12:20 y la DS-1:0,12:20-NaOH en comparación con la IND a 37°C a pH 4,5. — IND materia prima; — DS-1:0,12:20; — DS-1:0,12:20-NaOH.

Se puede concluir que todas las DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH aumentan significativamente ($P<0,05$) la cantidad de IND disuelta en comparación con las DS con proporciones IND:LSS:L-HPC equivalentes elaboradas con tampón fosfato.

Por tanto, para la realización de los estudios *in vivo* se elige la DS-1:0,12:5-NaOH, ya que presenta el mejor perfil de disolución, aunque la DS-1:0,12:20-NaOH presenta una ligera mejora en el perfil de disolución, no existen diferencias significativas entre ellas ($P<0,05$) y por tanto se selecciona la formulación con menor cantidad de excipientes.

Como consecuencia de estos incrementos estadísticamente significativos en la velocidad de disolución podrían conllevar aumentos también significativos en la eficacia terapéutica de estas formulaciones.

5.3.3. SEM

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para estudiar las características de superficie y morfológicas de diferentes muestras IND materia

prima, L-HPC, DS-1:0,12:0-NaOH, DS-1:0,12:5-NaOH, DS-1:0,12:20-NaOH, MF-1:0,12:5-NaOH y MF-1:0,12:20-NaOH).

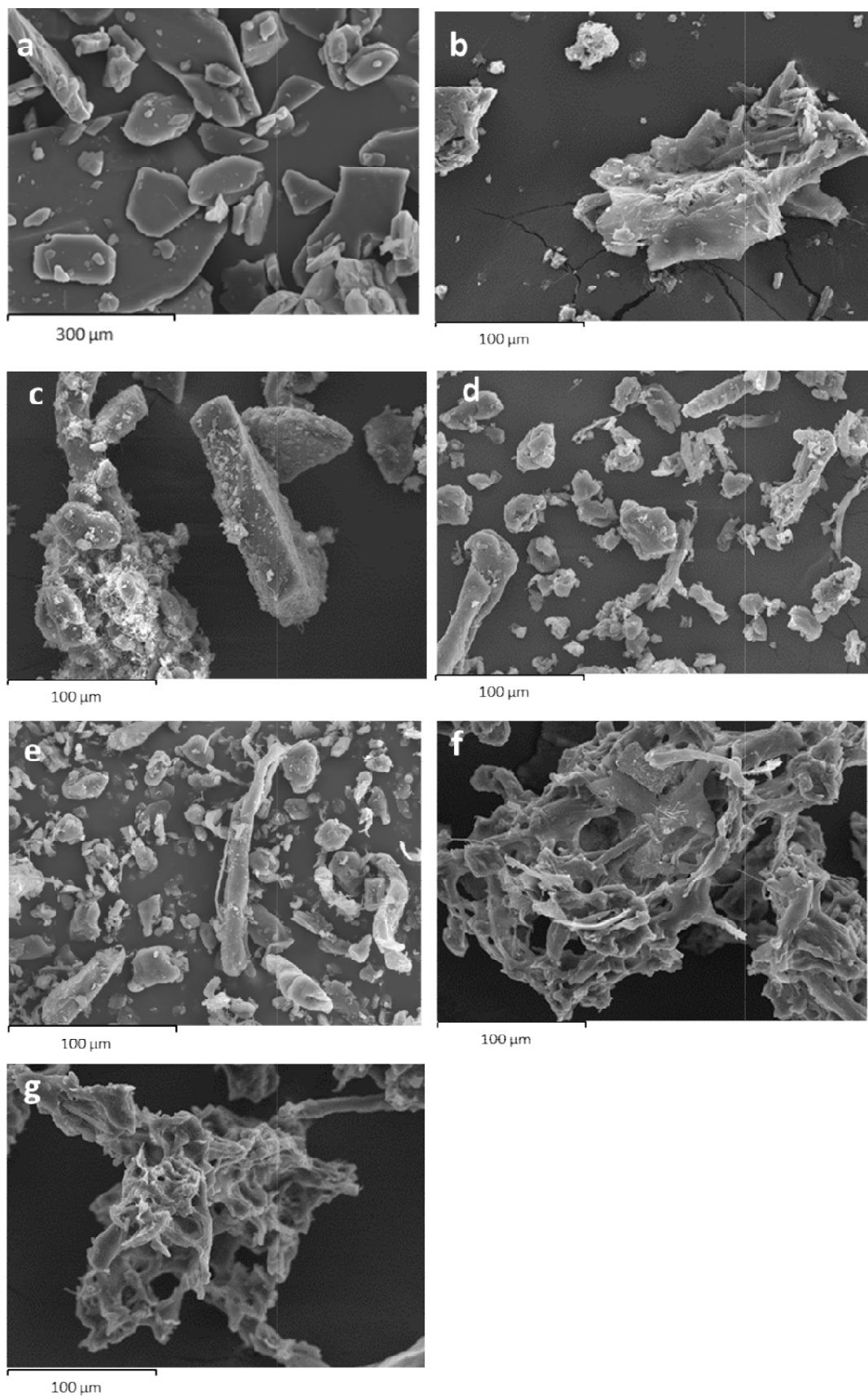


Figura 5.10: Microfotografías de las distintas formulaciones de IND elaboradas con NaOH, a 500x. IND materia prima (a); DS-1:0,12:0-NaOH (b); MF-1:0,12:5-NaOH (c); MF-1:0,12:20-NaOH (d); LHPC (e); DS-1:0,12:5-NaOH (f); DS-1:0,12:20-NaOH (g).

La IND pura presentaba escamas cristalinas heterogéneas de diferentes tamaños (Figura 5.10.a).

La morfología original de todos los componentes desapareció en las DS (DS-1:0,12:0-NaOH, DS-1:0,12:5-NaOH y DS-1:0,12:20-NaOH), observándose únicamente fibras de L-HPC tanto en la DS-1:0,12:5-NaOH, como en la DS-1:0,12:20 –NaOH.

Al comparar las MF-1:0,12:5-NaOH (Figura 5.10.c), MF-1:0,12:20-NaOH (Figura 5.10.d) con las DS-1:0,12:5-NaOH (Figura 5.10.f) y DS-1:0,12:20-NaOH (Figura 5.10.g), las partículas lisas de L-HPC (Figura 5.10.e) se pueden distinguir fácilmente de los cristales heterogéneos con bordes, posiblemente relacionados con IND, en las mezclas físicas, pero no en las DS, ya que estas últimas no presentan estas estructuras, sino que éstas presentan estructuras más parecidas a una matriz.

Al igual que se observaba en las DS elaboradas con solución tamponada de fosfato, cuanto mayor es la carga de L-HPC, menor es la porosidad de la matriz.

Se aprecia una clara diferencia en el tamaño de los poros de la DS-1:0,12:5-NaOH y de la DS-1:0,12:20-NaOH, siendo éste mayor en la DS-1:0,12:5-NaOH. Esto explica, los resultados obtenidos en el apartado de velocidad de disolución, en los que se observaba un perfil de velocidad de disolución similar entre la estas dos formulaciones, a pesar del incremento en la cantidad de L-HPC. (Garidel, et al., 2015).

A la vista de estos resultados, en las DS se observa que se ha formado una matriz de L-HPC donde se encontraría el principio activo disperso de una manera uniforme.

Comparación de las formulaciones de IND elaboradas en medio alcalinizado de fosfato con las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.

Como se puede observar en la Figura 5.11, el tamaño de los poros de las dispersiones elaboradas con una solución tamponada de fosfato es inferior al que presentan las correspondientes DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.

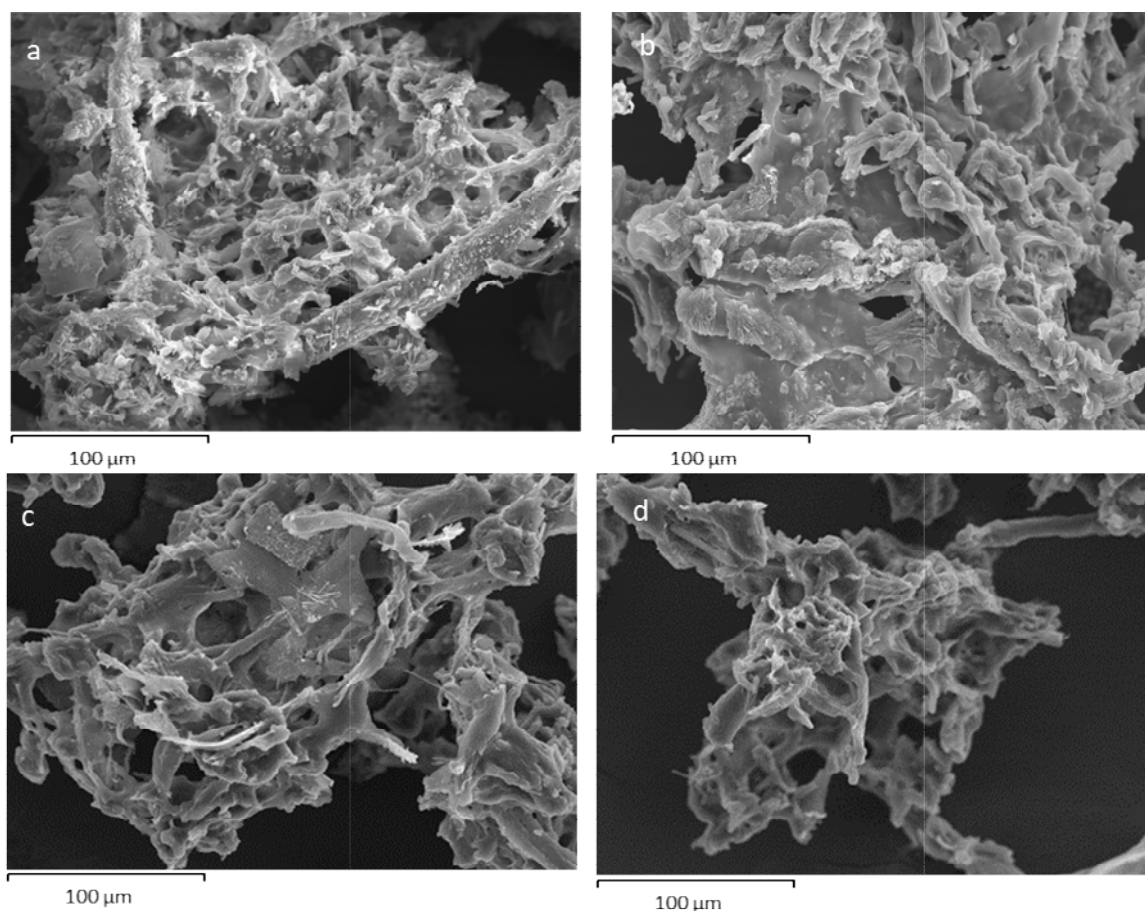


Figura 5.11: Microfotografías de las formulaciones DS-1:0,12:5 (a); DS-1:0,12:20 (b); DS-1:0,12:5-NaOH (c) y DS-1:0,12:20-NaOH (d), a 500x

Estos resultados explican los mejores perfiles de disolución ($P < 0,05$) presentados por las DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH. Otros autores han observado también la relación entre la presencia de poros y el aumento en la velocidad de disolución del fármaco contenido en la estructura porosa. (Chavda y Chhaganbhai, 2010; Mabroukab et al., 2015 Saffari, et al, 2016 Ebrahimi, et al., 2017).

Tanto en las en las DS elaboradas con medio tamponado de fosfato como en las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH, se observa que el tamaño de los poros es mayor a medida que disminuye la cantidad de L-HPC. En

comparación con las DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH, en las DS elaboradas con medio tamponado de fosfato, el proceso de liofilización es menos efectivo (poros más pequeños) y por tanto se necesitan mayores cantidades de L-HPC para conseguir mejores perfiles de velocidad de disolución. Esto puede ser debido a la ausencia de las sales que componen la solución tamponada de fosfato, ya que éstas hacen que los poros que se forman tras la liofilización sean muy pequeños y limitan la velocidad con la que el agua de reconstitución llega a los poros, retrasando así el proceso de rehidratación. (Garidel, et al., 2015).

5.3.4. XRPD

La figura 5.12 muestra los patrones de difracción de rayos X de IND materia prima, DS-1:0,12:0-NaOH, DS-1:0,12:5-NaOH, DS-1:0,12:20-NaOH, MF-1:0,12:5-NaOH, MF-1:0,12:20-NaOH y LHPC.

La IND materia prima es cristalina, como lo demuestran los picos de difracción agudos e intensos (Figura 5.12.a). Los patrones de difracción de rayos X fueron similares a los reportados por otros autores (Semjonov et al., 2016). La estructura cristalina de la IND con picos afilados en $11,6^\circ$, $17,2^\circ$, $19,5^\circ$, $21,6^\circ$ y $29,3^\circ$ (2θ) se corresponde con el polimorfo γ , como ya se ha observado en el apartado 4 de esta tesis *“Dispersiones sólidas de IND elaboradas en agua alcalinizada con NaOH”*.

Por otra parte, la MF-1:0,12:5-NaOH mostró picos de difracción correspondientes a los cristales de IND y de LSS (Figura 12.a). En el caso de la MF-1:0,12:20-NaOH, estos picos no son tan apreciables, al ser mayor la cantidad de L-HPC se produce una disminución de los picos característicos de la IND, como consecuencia del efecto de dilución que produce la L-HPC en la muestra, disminuyendo la pureza de los componentes presentes en la misma (Palmeiro-Roldán, et al., 2014). Asimismo, la DS-1:0,12:0-NaOH (Figura 5.12.b) mostró picos muy similares a $14,59^\circ$ y $23,05^\circ$ (2θ), que están relacionados con el LSS, sin embargo no se observaron los picos característicos de la IND, debido probablemente a la amorfización del fármaco. Esta disminución en la cristalinidad del medicamento podría deberse al proceso de liofilización (Palmeiro-Roldán, et al., 2014) que a su vez, podría estar relacionada con las

mejoras en los perfiles de disolución como se observó en los ensayos de disolución.

El resto de DS con L-HPC (Figuras 5.12.d y 5.12.e) al igual que la DS-1 0,12:0-NaOH (Figura 5.12.g), no muestran ninguno de los picos atribuidos a la IND.

El patrón de difracción de rayos X de L-HPC para la DS-1:0,12:5-NaOH 20,29° (2 θ), y DS-1:0,12:20-NaOH 21,73° (2 θ), (Figuras 5.12.e y 5.12.e), presentó un halo amplio entre 19,8° y 28,4° 2 θ y también picos pequeños difíciles de observar. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (García-Rodríguez, et al., 2011).

Como se puede observar en la figura 5.12, el halo característico de la L-HPC, es mayor en las mezclas físicas con respecto a las DS con la misma proporción IND:LSS:L-HPC. La menor cristalinidad en el halo atribuido a la L-HPC en las DS puede confirmar que el proceso de liofilización disminuye la cristalinidad de esta matriz en estas formulaciones.

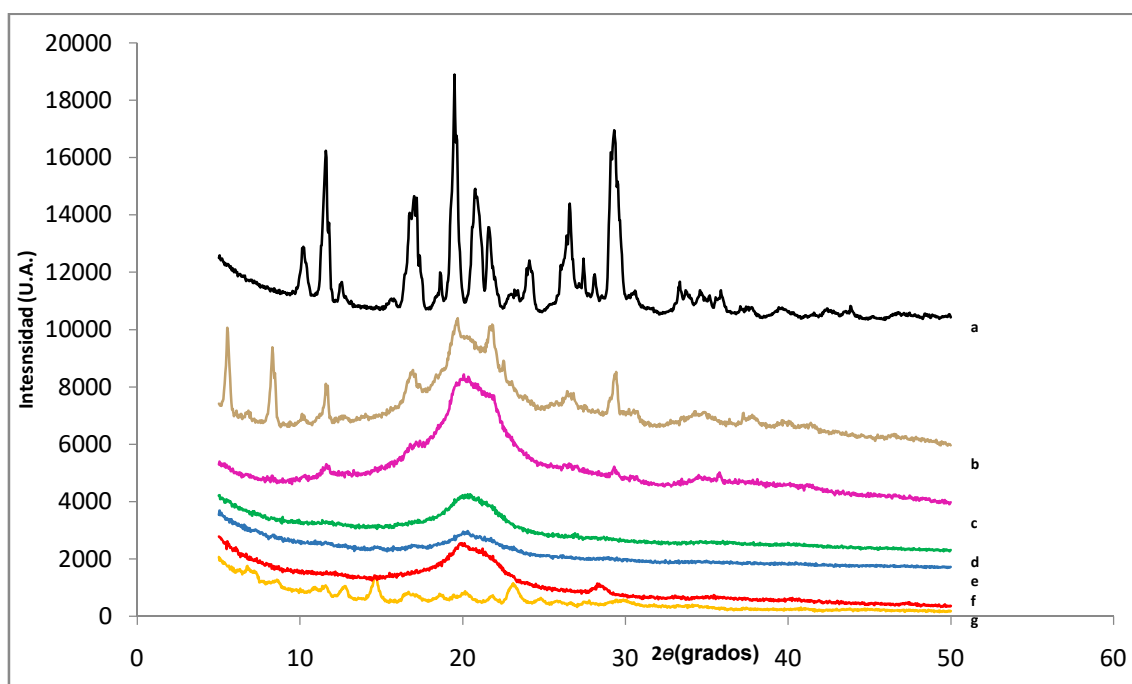


Figura 5.12: Difractogramas de las diferentes formulaciones de IND: IND materia prima (a), MF-1:0,12:5-NaOH (b); MF-1:0,12:20 (c), DS-1:0,12:20-NaOH (d); DS-1:0,12:5-NaOH (e), L-HPC (f); DS-1:0,12:0-NaOH (g).

Comparación de las formulaciones de IND elaboradas en una solución tamponada de fosfato y las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH

Tanto en las formulaciones de IND elaboradas en una solución tamponada de fosfato como en las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH, se observa la desaparición de los picos característicos de la IND, en las DS de IND lo que indica que el fármaco se encuentra en estado amorfo.

Cabe destacar que en los resultados de XRPD de las formulaciones elaboradas en agua alcalinizada con NaOH resulta más sencillo observar este hecho, debido a la ausencia de picos de otros componentes de la formulación como el ácido bórico que está presente en las formulaciones elaboradas en una solución tamponada de fosfato.

5.3.5.DSC

La figura 5.13 muestra los termogramas IND-MP; DS-1:0,12:0-NaOH, DS-1:0,12:5-NaOH, DS-1:0,12:20-NaOH, MF-1:0,12:20-NaOH y L-HPC.

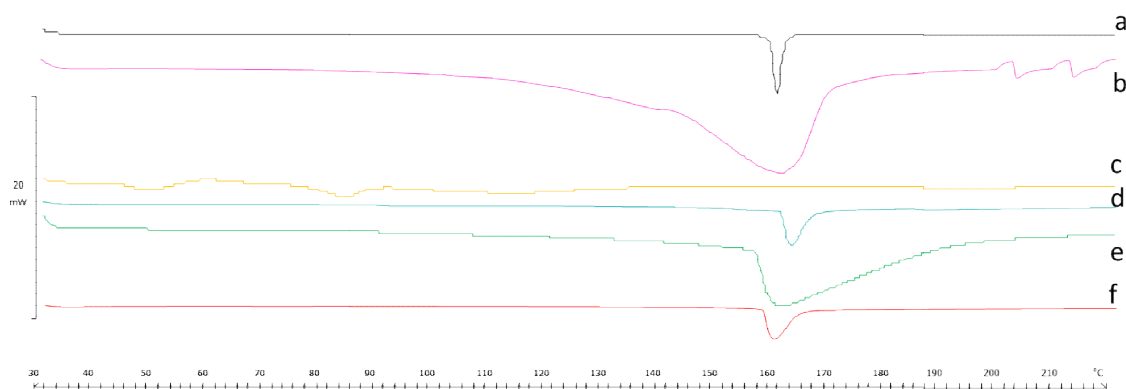


Figura 5.13: Espectros calorimétricos de las diferentes formulaciones de IND: IND materia prima (a), MF-1:0,012:20-NaOH (b); DS-1:0,12:0-NaOH (c); DS-1:0,12:5-NaOH (d); DS-1:0,12:20-NaOH (e) y L-HPC (f).

La IND materia prima (Figura 5.13.a) presenta un pico endotérmico ancho a 160,99° C (116,05 J / g) que corresponde a la fusión de la sustancia (Rojas-Oviedo, et al., 2012).

Por otro lado, la MF-1:0,12:20-NaOH (Figura 5.13.b) mostró un pico a 160,80° C (101,71 J / g) que puede ser correspondiente a la L-HPC, que como se

observa en la figura 5.13.f presenta un pico endotérmico a 158,31° C (66,28 J / g) como reportaron otros autores (Palmeiro-Roldán, et al., 2014), pero también coincide con el pico endotérmico característico de la IND. Teniendo esto en cuenta, es posible que la aparición de estos dos picos juntos indique que se está produciendo una interacción sólido-sólido, sin implicar esto necesariamente una incompatibilidad farmacéutica (Pani, et al., 2012).

En el termograma DS-1:0,12:0-NaOH, no se observan picos significativos, este hecho que podría estar relacionado con la disminución de la cristalinidad de la IND que al estar en estado amorfo, posiblemente debido al proceso de liofilización. Además, al no contener L-HPC tampoco se observa el halo característico de este excipiente (Figura 5.14).

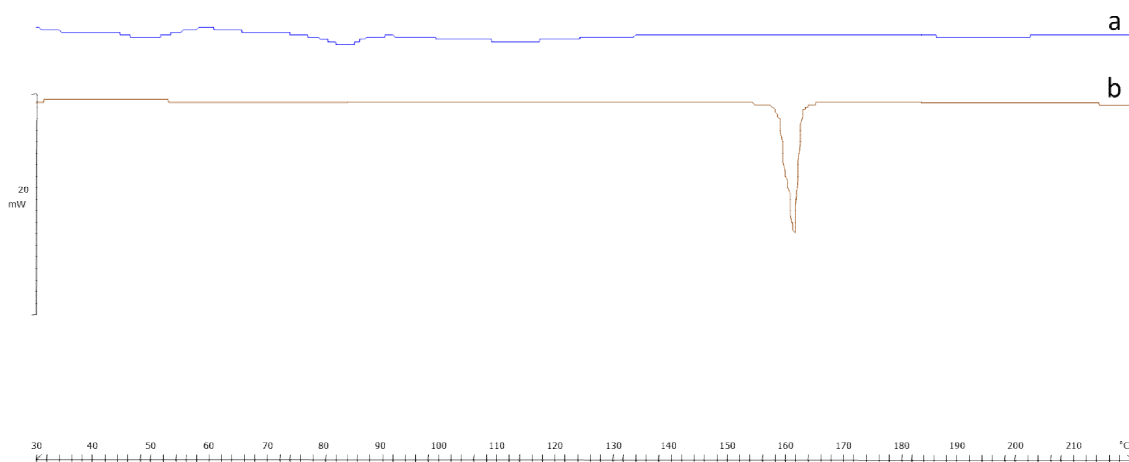


Figura 5.14: Espectros calorimétricos de IND (a) y DS-1:0,12:0-NaOH (b).

Las dispersiones sólidas IND:LSS:L-HPC (DS-1:0,12:5-NaOH y DS-1:0,12:20-NaOH) mostraron un pico entre 156°-160°C que se correspondió con la matriz L-HPC (Figuras 5.13.d y 5.13.e).

Comparación de las formulaciones de IND elaboradas en medio alcalinizado de fosfato con las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.

Al igual que ocurrió con las DS de IND elaboradas con solución tamponada de fosfato, los estudios de DSC confirmaron la transformación de la IND en su forma amorfa. Además esta hipótesis fue respaldada por los estudios de Difracción de rayos X y por los estudios de velocidad de disolución, en los que

se demostró que la velocidad de disolución se veía incrementada en las DS, siendo una posible explicación el estado amorfo del principio activo.

5.3.6. Estudio farmacocinético de las formulaciones seleccionadas tras la administración oral

Los perfiles farmacocinéticos de cada una de las formulaciones seleccionadas y de la IND aparecen reflejados en la figura 5.15.

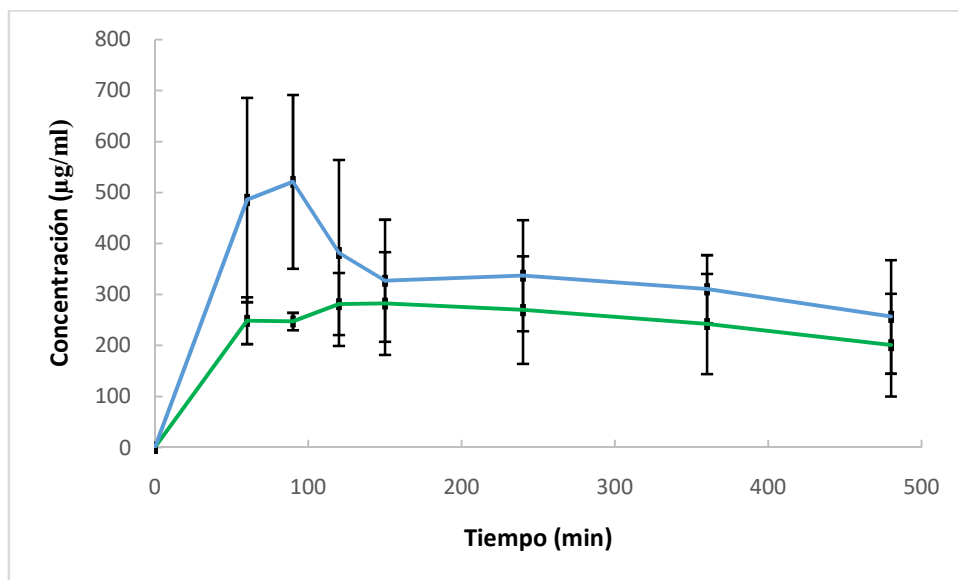


Figura 5.15: Representaciones gráficas de los valores medios y desviaciones estándar de las concentraciones plasmáticas de IND en las formulaciones de IND materia prima y DS-1:0,12:5-NaOH tras la administración oral de una dosis única de 5 mg/kg de principio activo. — IND; — DS-1:0,12:5-NaOH.

Como se puede observar, tras la administración oral de 5 mg/kg de fármaco, las formulaciones presentan un perfil plasmático muy similar, aunque con la DS-1:0,12:5-NaOH se alcanza la concentración máxima más rápido y además es significativamente superior a la alcanzada con la IND a ese mismo tiempo ($P < 0,05$). Con la DS se observó una distribución más rápida del fármaco en el torrente sanguíneo, ya que la concentración máxima se alcanzó a los $82,5 \pm 15$ min, con una concentración de fármaco disuelto de $591,727 \pm 117,903$ (µg/ml). En cambio la IND materia prima, tiene un perfil con una fase de absorción menos marcada (Figura 5.15), y una fase de eliminación también más lenta, alcanzando valores de $343,14 \pm 75,53$ µg/ml a los $142,5 \pm 75$ min.

Cuando se administró la IND como DS-1:0,12:5-NaOH, las concentraciones en plasma del fármaco aumentaron significativamente en comparación con la administración de IND materia prima ($P < 0,05$), a tiempos cortos. En otras ocasiones se ha logrado un aumento en las concentraciones plasmáticas de un fármaco poco soluble en agua, mediante formas sólidas amorfas producidas por un proceso de liofilización similar (Zhang et al., 2012; de la Torre-Iglesias et

al., 2014). El uso de una forma amorfa de medicamentos poco solubles en agua ha ampliado enormemente la ventana de rendimiento farmacocinético alcanzable. El perfil de disolución más lento que presenta la IND pura, probablemente ha sido el factor limitante de la velocidad en estudios farmacocinéticos después de la administración oral de IND (Dayan 2003; de la Torre-Iglesias et al., 2014).

Sin embargo, a partir de los 90 min no se observan diferencias significativas en el perfil farmacocinético de ambas formulaciones ($P>0,05$).

Uno de los principios fundamentales de la farmacología es la relación en el tiempo que existe entre el efecto del fármaco y la cantidad del mismo en el lugar de acción. La cantidad de fármaco presente en el organismo está directamente relacionada con los procesos de absorción, distribución y eliminación del fármaco, y también con la naturaleza del principio activo y el régimen de dosificación empleado. Continuando con nuestro objetivo de evaluar los datos de concentraciones plasmáticas frente al tiempo, se calcularon los siguientes parámetros:

C_{max} : Concentración máxima plasmática.

T_{max} : Tiempo al que se alcanza la concentración máxima.

AUC_0^∞ : Área bajo la curva de niveles plasmáticos.

Los resultados farmacocinéticos obtenidos aparecen reflejados en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Parámetros farmacocinéticos de IND en diferentes formulaciones tras la administración oral de una única dosis de fármaco (5 mg/kg).

Formulaciones	Parámetros		
	T_{max} (min)	C_{max} (µg/ml)	AUC_0^∞ (µg·min/ml)
IND	142,5±75,0	343,14±75,53	421260,96 ±28732,35
DS-1:0,12:5-NaOH	82,5±15,0	591,73±117,90	668480,38 ±194437,83

Se puede observar que la absorción de IND tras la administración de la formulación DS-1:0,12:5-NaOH fue rápida, a los 82,5 ±15,0 min se alcanzaron los máximos valores de concentración plasmática. Asimismo, los valores de C_{max} y AUC de la sustancia activa fueron significativamente superiores

($P < 0,05$) tras la administración oral de DS-1:0,12:5-NaOH a los observados tras la administración de IND materia prima. Probablemente debido al estado amorfo en el que se encuentra el fármaco, como se ha podido comprobar en los ensayos de DSC y XRPD. Por otra parte, el efecto de la L-HPC para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles, como la IND, han sido reportados por otros autores (Torrado et al., 1997; Daniel-Mwambete et al., 2004; Beinborn et al., 2012; de la Torre-Iglesias et al., 2014).

Sin embargo, en el caso de la DS-1:0,12:5-NaOH, después de alcanzar la $C_{\text{máx}}$, las concentraciones plasmáticas disminuyeron bruscamente, alcanzando un valor de $327,39 \pm 119,84 \mu\text{g} / \text{mL}$ a las 2 horas y media, similares a las obtenidas en el mismo momento después de la administración de IND materia prima de IND ($282,71 \pm 100,83 \mu\text{g} / \text{mL}$) (de la Torre-Iglesias et al., 2014).

Las concentraciones plasmáticas de este fármaco en ambas formulaciones (IND materia prima y DS) presentaron una alta variabilidad después de su administración oral. En este estudio, la baja solubilidad del fármaco ha limitado su absorción y cinética después de la administración oral bajo estas formas de dosificación. Se observó un resultado similar cuando se administraron fármacos similares de baja solubilidad y permeabilidad (Dayan, 2003 y Krishnaiah et al., 2003).

A continuación, se estudió la bioequivalencia de las dos formulaciones, mediante la comparación de los valores de AUC_0^∞ y C_{max} por un análisis de varianza (ANOVA). Los valores de probabilidad (P) estudiada entre ambas formulaciones se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2: Los valores de probabilidad (P) del análisis ANOVA con un nivel de confianza de 95% entre cada una de las formulaciones estudiadas con los valores de C_{max} y AUC_0^∞ .

Parámetros	Valor de P
C_{max}	0,0188
AUC_0^∞	0,0235

En primer lugar, a la vista de los resultados mostrados en la tabla 5.2 se puede concluir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las AUC

totales de las dos formulaciones, ya que el valor de P obtenido en el análisis ANOVA sobre $C_{\text{máx}}$ entre ambas formulaciones es menor de 0,05.

Por otra parte, también se observan diferencias significativas en las $C_{\text{máx}}$ de la IND materia prima y la DS-1:0,12:5-NaOH ($P < 0,05$).

Los resultados farmacocinéticos obtenidos pueden verse influidos por los excipientes utilizados y el proceso de preparación de las formulaciones. El proceso de liofilización y la L-HPC utilizada como excipiente, aumentaron la solubilidad de IND, y también de esta forma mejoraron los valores farmacocinéticos y biofarmacéuticos de la IND.

5.4. Bibliografía

- Beinborn, N. A., Dua, J., Wiederhold, N. P., Smyth, H. D., Williams, R. O. (2012): "Dry powder insufflation of crystalline and amorphous voriconazole formulations produced by thin film freezing to mice", *Eur J Pharm Biopharm*, 81(3), pp. 600–608.
- Chavda, H. y Patel, C. (2010): "Chitosan superporous hydrogel composite-based floating drug delivery system" *J Pharm Bioallied Sci.*, 2(2), pp. 124–131.
- Dahlberg, C., Millqvist-Fureby, A., Schuleit, M. y Furó, I. (2010): "Polymer-drug interactions and wetting of solid dispersions", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(1-3), pp. 125-33.
- Daniel-Mwambete, K., Torrado, S., Cuesta-Bandera, C., Ponce-Gordo, F., Torrado, J. J. (2004): "The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs", *Int J Pharm*, 272(1–2), pp. 29–36.
- Dayan, A. D. (2003): "Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics", *Acta Trop*, 86(2–3), pp. 141–159.
- de la Torre-Iglesias, P. M., García-Rodríguez, J. J., Torrado, G., Torrado, S., Torrado-Santiago, S., Bolás-Fernández, F. (2014): "Enhanced bioavailability and anthelmintic efficacy of mebendazole in redispersible microparticles with low-substituted hydroxypropylcellulose", *Drug Design, Development and Therapy*, 8, pp. 1467–1479.
- Dharmalingam K, Anandalakshmi R. (2019): "Fabrication, characterization and drug loading efficiency of citric acid crosslinked NaCMC-HPMC hydrogel films for wound healing drug delivery applications". *Int J Biol Macromol*, (134), pp. 815-829.
- Ebrahimi, A., Saffari M. y Langrish, T. (2017): "Improving the dissolution rate of hydrophobic drugs through encapsulation in porous lactose as a new biocompatible porous carrier" *Int J Pharm*, 521 (1–2), pp. 204-213.

- García-Rodríguez, J.J., de la Torre-Iglesias, P.M., Vegas-Sánchez, M.C., Torrado-Durán, S., Bolás-Fernández, F. y Torrado-Santiago, S. (2011): "Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: Improved anthelmintic activity", *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), pp. 23-28.
- Garidel, P., Pevestorf, B., Bahrenburg, S. (2015) "Stability of buffer-free freeze-dried formulations: A feasibility study of a monoclonal antibody at high protein concentrations" *Eur J Pharm Biopharm*, 97, pp.125-139.
- Gómez-Burgaz, M., Torrado, G., Torrado y S. (2009): "Characterization and superficial transformations on mini-matrices made of interpolymer complexes of chitosan and carboxymethylcellulose during *in vitro* clarithromycin release", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(1), pp. 130-139.
- Krishnaiah, Y. S., Veer, R. P., Dinesh, K. B., Satyanarayana, V., Karthiekeyan, R. S., Bhaskar, P. (2003): "Pharmacokinetic evaluation of guar gum-based colon-targeted drug delivery systems of mebendazole in healthy volunteers", *J Control Release*, 88(1), pp. 95–103.
- Liu, P., De Wulf, O., Laru, J., Heikkilä, T., Van Veen, B.Kiesvaara, J Hirvonen, J Peltonen, L y Laaksonen T. (2013): "Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions". *AAPS PharmSciTech*, 14(2), pp. 748-756.
- Mabroukab, M., Chejaraa, D.R., Mullaac, J.A.S., Badhea, R.V., Choonaraa, Y.E., Kumara, P., du Toita, L.C., Pillaya, V. (2015): "Design of a novel crosslinked HEC-PAA porous hydrogel composite for dissolution rate and solubility enhancement of efavirenz" *Int J Pharm*, 490, (1–2), pp. 429-437.
- Palmeiro Palmeiro-Roldán R, Fonseca-Berzal C, Gómez-Barrio A, Arán VJ, Escario JA, Torrado-Durán S, Torrado-Santiago S. Development of novel benzimidazole formulations: physicochemical characterization and *in vivo* evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. *Int J Pharm* 2014;472(1-2):110-7.
- Pani NR, Nath LK, Acharya S, Bhuniya B. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. *J Therm Anal Calorim* 2012;108:219–26.

- Pralhad, T. y Rajendrakumar, K. (2004): "Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(2), pp. 333-339.
- Rojas-Oviedo, I., Retchkiman-Corona, B., Quirino-Barreda, C.T., Cárdenas, J. y Schabes-Retchkiman, PS. (2012): "Solubility enhancement of a poorly water soluble drug by forming solid dispersions using mechanochemical activation", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(6), pp. 505-511.
- Saffari, M., Ebrahimi, A. y Langrish, T. (2016): "A novel formulation for solubility and content uniformity enhancement of poorly water-soluble drugs using highly-porous manitol" *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, pp. 52-61.
- Semjonov, K., Kogermann, K., Laidmäe, I., Antikainen, O., Strachan, C.J., Ehlers, H., Yliruusi, J. y Heinämäki, J. (2016): "The formation and physical stability of two-phase solid dispersion systems of indomethacin in supercooled molten mixtures with different matrix formers", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, pp. 237-46.
- Sun, Y., Zhu, L., Wu, T., Cai, T., Gunn, E.M. y Yu, L. (2012): "Stability of amorphous pharmaceutical solids: crystal growth mechanisms and effect of polymer additives", *The AAPS Journal*, 14(3), pp. 380-388.
- Torrado, S., López, M. L., Torrado, G., Bolás F, Torrado S, Cadórniga R. (1997): "A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation", *Int J Pharm*, 156, pp. 181–187.
- USP 42 (United States Pharmacopoeia 42). 2019.
- Yamashita, K., Nakate, T., Okimoto, K., Ohike, A., Tokunaga, Y., Ibuki, R., Higaki, K., Kimura, T. (2003): "Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus" *Int J Pharm*, 267(1-2), pp. 79-91.
- Zhang, M., Li, H., Lang, B., O'Donnell, K., Zhang, H., Wang, Z., Dong, Y., Wu, C. y Williams R. O. tercero (2012): "Formulation and delivery of improved amorphous fenofibrate solid dispersions prepared by thin film freezing", *Eur J Pharm Biopharm*, 82(3), pp.534–544

DISPERSIONES SÓLIDAS DE IND
PREPARADAS EN AGUA
ALCALINIZADA CON NaOH PARA
ADMINISTRACIÓN TÓPICA.

6. Dispersiones sólidas de IND preparadas en agua alcalinizada con NaOH para administración tópica.

6.1. Introducción

La piel es un órgano complejo y heterogéneo cuyo peso constituye el 16% del peso total del cuerpo y tiene una superficie de aproximadamente 1,9 m². La piel tiene múltiples funciones; la más importante es representar una barrera física y química que protege al cuerpo tanto contra la absorción de la radiación ultravioleta como contra la entrada de sustancias externas del medio ambiente, como bacterias, microorganismos y alérgenos. Además, la piel evita la pérdida de elementos endógenos, electrolitos, nutrientes y especialmente agua. También está involucrado en los procesos de termorregulación y percepción sensorial porque es el lugar de nuestras experiencias de calor, frío y dolor físico. (Merino y Noriega, 2015).

Teniendo en cuenta la estructura, la localización anatómica y el origen embrionario de las células, es posible dividir la piel en tres regiones diferentes: la epidermis, la dermis y la hipodermis.

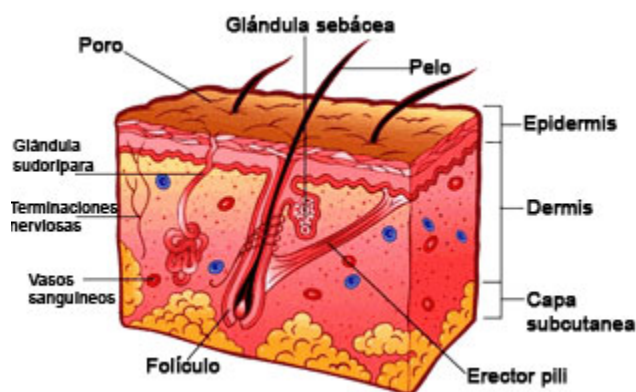


Figura 6.1: Capas de la piel. (Merino y Noriega, 2015).

La epidermis está formada principalmente por tejido epitelial sin vasos sanguíneos en su interior. Representa la región externa de la piel, que se desarrolla a partir del ectodermo embrionario. Tiene un espesor de 50-150 µm dependiendo de la ubicación y está constituido por cuatro tipos de células: los

queratinocitos, los melanocitos, las células de Merkel y las células de Langerhans.

La epidermis se puede dividir en cinco capas (World Health Organization, WHO, 2006):

- **Capa basal**, también llamado estrato germinativo, es la capa epidérmica más profunda, muy adherida a la lámina basal, debajo de la cual se encuentra la dermis. Está compuesta de una sola capa de células madre de forma cuboidal, conocidas como células basales, que atraviesan constantemente la mitosis para producir nuevas células que se diferenciarán en los queratinocitos; a medida que se forman nuevas células, las existentes se dirigen a la superficie de la epidermis. Entre las células basales en esta capa también se dispersan los melanocitos y las células merckell.
- **Capa de células espinosas**, esta capa es multicapa, está formado por entre ocho y diez de queratinocitos que se caracterizan por estructuras llamadas desmosomas. Los desmosomas dan la apariencia espinosa y se entrelazan entre sí y fortalecen el enlace entre las células.
Aquí comienza la síntesis de la queratina y, a medida que se producen nuevas células en el estrato basal, los queratinocitos de este estrato se mueven al estrato granuloso. Entre los queratinocitos, se encuentran dispersas las células de Langherans, para proteger de las bacterias envolventes, partículas extrañas y células dañadas.
- **Capa granular**, está formada por entre tres y cinco capas de células y aquí la estructura de los queratinocitos se enfrenta a algunos cambios; comienzan a producir una gran cantidad de queratina.
- **Capa lúcida**, se encuentra normalmente en la parte gruesa de la piel de las palmas de las manos y plantas de los pies, no existe en la piel delgada. Consiste entre tres y cinco filas de células muertas, claras y planas que contienen aún actividad enzimática.
- **El estrato córneo** está formado por células aplanadas y restos de células situadas unas sobre otras en forma de tejas y fuertemente empaquetadas, que han perdido núcleo y orgánulos citoplasmáticos quedando compuestas casi exclusivamente por filamentos de queratina

agrupados en haces denominados monofilamentos. Está formado por 15 a 20 estratos celulares, de los cuales el último se va perdiendo por descamación. Este proceso de continuo desgaste y reemplazo renueva la totalidad de la capa epidérmica en un periodo aproximado de 30 días, desde que se produce la división celular hasta que la célula cae desprendida de la superficie de la piel.

La dermis, interpuesta entre la epidermis y la hipodermis, contiene vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y otras estructuras, como los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas. Histológicamente, se divide en dos capas, que desde el exterior al interior son (Merino y Noriega, 2015):

- La capa papilar: contiene papilas dérmicas en las que se encuentran las asas capilares que proporcionan los nutrientes a la epidermis avascular. La capa papilar también contiene numerosas terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos.
- La capa reticular: es más gruesa que la papilar, y recibe ese nombre por el entramado o retícula de las fibras colágenas que forman gruesos haces entrelazados con haces de fibras elásticas. Esta estructura es la que proporciona elasticidad y capacidad de adaptación a movimientos y cambios de volumen.

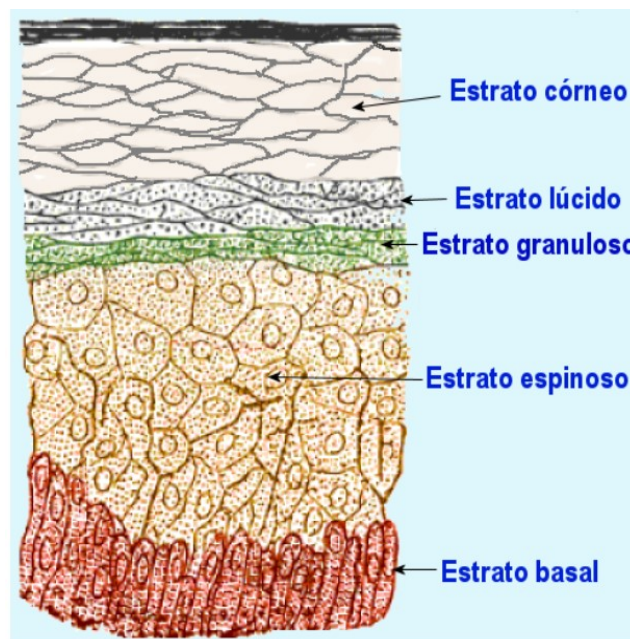


Figura 6.2: Capas de la epidermis. (Merino y Noriega, 2015).

Las terapias tópicas siguen siendo el tratamiento principal de una variedad de afecciones de la piel (Hanifin et al., 2004; Wollina, 2014; Stein Gold, 2014). La vía tópica tiene una ventaja obvia en términos de seguridad porque minimiza la exposición sanguínea y reduce los efectos secundarios sistémicos (Hwa et al., 2011).

Las técnicas convencionales de administración de fármacos no siempre son aplicables. La administración percutánea, tanto de fármacos con acción tópica como sistémica, es una alternativa actualmente muy empleada.

Sin embargo, las principales dificultades de esta vía de administración son alcanzar el sitio de acción (epidermis o dermis) en la concentración necesaria para la eficacia y con el tiempo de residencia óptimo. Esto se debe en parte a la estructura altamente organizada de la piel con una capa externa, el estrato córneo, que actúa como una barrera eficaz contra la penetración de elementos exógenos y la pérdida de agua (Matsui y Amagai, 2015).

Son varios los procesos necesarios para que se produzca la penetración de un principio activo hasta la circulación sistémica o los tejidos circundantes: disolución y liberación, reparto dentro del estrato córneo, difusión a través del estrato córneo, reparto desde el estrato córneo hacia la fase acuosa de la epidermis, difusión a través de la dermis y acceso a la circulación sistémica y/o tejidos circundantes. (Villarino y Landoni, 2006).

La capacidad de difusión de los fármacos a través de las membranas biológicas depende de su peso y tamaño molecular, del grado de ionización y solubilidad; del equilibrio entre la liposolubilidad e hidrosolubilidad y del grado de ionización. (Villarino y Landoni, 2006).

Se ha planteado que el éxito de todo sistema terapéutico transdérmico (STT) depende de la capacidad de la sustancia de difundirse a través de la piel en cantidades suficientes para lograr el efecto terapéutico deseado. (Escobar, et al., 2002).

Todos los sistemas de este tipo, que se encuentran actualmente en el mercado, contienen principios activos con un coeficiente de difusión

dependiente de la naturaleza del polímero y del tamaño molecular del principio activo. (Escobar, et al., 2002).

Estos sistemas obtienen niveles constantes y bajos de sustancia activa en plasma para lograr su efectividad terapéutica.

Con el objetivo de incrementar la penetración de fármacos a través de la piel, actualmente se intenta reducir la función barrera del estrato córneo, siguiendo diferentes estrategias, uso de promotores químicos de absorción transdérmica y uso de promotores físicos.

Los promotores físicos más usados son: la hidratación, la iontoforesis, la termoforesis, la sonoforesis, las microagujas y la radiación láser.

Los promotores químicos de absorción transdérmica son sustancias químicas de diversa naturaleza que actúan reversiblemente a nivel del estrato córneo, desestructurando y facilitando que el fármaco pase más rápidamente hacia los tejidos viables y de ahí a circulación sistémica.

Para que una sustancia química sea promotor de la penetración cutánea debe reunir las siguientes características (Alexander et al., 2012):

- Ser inerte y estable desde el punto de vista farmacológico, físico y químico.
- Ser potente, con actividad específica y producir efectos reversibles en la piel.
- Ser compatible con el fármaco y el resto de excipientes de la formulación.
- No debe ser irritante, alergénico ni fototóxico.
- Poseer buenas características organolépticas.
- Producir su efecto rápidamente y con una duración predecible y reproducible.
- Ser unidireccional: permitir que el fármaco se introduzca en el cuerpo, evitando la pérdida de materiales endógenos del cuerpo.

Según su mecanismo de acción **los promotores de la absorción** se pueden dividir en los que actúan (Moser et al., 2001):

- Aumentando el coeficiente de difusión a través de ácidos grasos promotores que desorganizan los lípidos del estrato córneo.
- Aumentando la solubilidad del principio activo en la membrana.
- Aumentando tanto el coeficiente de difusión como el de solubilidad.
- Aumentando el nivel de saturación. La actividad termodinámica de un principio activo puede aumentarse incrementando la concentración en el vehículo o disminuyendo la solubilidad del principio activo en el disolvente.

Como ya se ha explicado en la Introducción general, la IND, tiene como uno de los principales y más graves efectos secundarios el sangrado gastrointestinal cuando se administra por vía oral.

La vía tópica, es una buena alternativa para evitar este efecto adverso y además aumentar el cumplimiento del paciente y evitar el efecto de primer primer paso hepático (Prausnitz y Langer, 2008).

Además, se ha visto que se consigue reducir la dosis de IND en plasma en comparación con las formulaciones orales y en consecuencia, se ven reducidos los efectos adversos sistémicos (Vaile y Davis, 1998; Bannwarth, 2006).

Sin embargo, hay autores que han observado que no existen diferencias significativas en la eficacia del tratamiento utilizando la formulación tópica comercial y el placebo (Moore, et al., 1998).

Esto se explica debido a la escasa solubilidad de la IND en agua y su solubilidad dependiente de pH, siendo únicamente soluble a pH básico en el que el fármaco se encuentra hidrolizado. Por lo tanto, la baja biodisponibilidad de la IND se puede atribuir a su escasa solubilidad en la piel. (Lin, et al., 1994).

Para aumentar la biodisponibilidad de la IND a través de la vía tópica se han seguido diferentes estrategias, como la nanoencapsulación (Waisudin, et al., 2018), etosomas (Sakdiseta, et al., 2019), liposomas, (Elsayed, et al., 2007), nanoemulsiones, (Mou, et al., 2008), y microemulsiones (Kogan y Garti, et al., 2006).

En este capítulo, con el objetivo de incrementar la solubilidad de la IND en la piel y con ello aumentar su biodisponibilidad, aumentando su absorción se ha desarrollado un gel de IND con la DS-1:0,12:5-NaOH (seleccionada por ser la que mejores características de solubilidad presenta, según los estudios de caracterización realizados). Asimismo, se ha comparado la velocidad de disolución *in vitro* de este gel de dispersión sólida con un gel de IND materia prima, así como la biodisponibilidad tópica mediante estudios *in vivo*.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Materiales

Se ha agrupado el material en: materias primas, reactivos, soluciones e instrumental.

Materias primas

- Indometacina (en adelante IND). Fagron Iberica[®] SAU, España.
- Lauril sulfato sódico (LSS). Fischer Scientific[®], Inglaterra.
- Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (en adelante L-HPC). Shin-Etsu[®], Tokio, Japón.
- HPG. Fagron Iberica[®] SAU, España.
- Transcutol[®]. Gattefossé[®] S.A., Francia.

Reactivos

- Ácido acético glacial. Calidad PRS- Codex. Panreac Química[®] S.A., España.
- Acetato sódico PRS. Panreac Química[®] S.A., España.

Soluciones

- Agua desionizada obtenida por un sistema Milli-Q[®] Millipore[®], Estados Unidos.

- Disolución normalizada de ácido acético 2 N según la USP 42: se añaden 116 ml de ácido acético glacial en un matraz aforado de 1000 ml y se enrasa con agua destilada.
- Tampón pH 4,5 según la USP 42: se añaden 2,99 g de acetato sódico trihidratado ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en un matraz aforado de 1000 ml, se añaden 14 ml de ácido acético 2N y se enrasa con agua destilada.

Instrumental

- Aparato de velocidad de disolución (paletas) DT80 (Erweka[®] GMBH, Germany).
- Espectrofotómetro UV-VIS 1,700 (Shimadzu[®], Japan).

6.2.2. Métodos

Método de elaboración de geles de IND.

Puesta a punto de preparación de los geles

Se probaron dos métodos de preparación:

A) Método del mortero: en primer lugar, se pulverizó la cantidad de formulación correspondiente a 65 mg de IND. Posteriormente, se agregaron 5 ml de tampón pH 4,5 al mortero y finalmente se añadió gradualmente y agitando con la mano del mortero la cantidad correspondiente de HPG para formar un gel al 1,75%.

B) Método de agitación magnética: en primer lugar, se pulverizó la cantidad correspondiente de la formulación a 65 mg de IND con ayuda de un mortero y luego se transfirió a un vaso de precipitados. Posteriormente, se agregaron 5 ml de tampón pH 4,5 al vaso de precipitados colocado en un agitador magnético para formar una suspensión. Finalmente, y siempre bajo agitación, se añadió la cantidad apropiada del polímero HPG para formar un gel al 1,75%.

En ambos métodos se formula el gel a pH 4,5 por ser un pH en el que, como se ha observado en los ensayos de disolución *in vitro* para las formulaciones de administración oral, se observan bien las diferencias entre las diferentes formulaciones de IND, y por tanto es un medio discriminativo. Así mismo, este pH es compatible con el pH de la piel.

La IND se ha cuantificado, por triplicado (n=3), 200 mg de cada una de las dos formulaciones (geles preparados por método A y método B). Cada muestra se solubilizó en 10 ml de etanol y se agitó en vórtex durante 1,5 minutos. Estos 10 ml se llevaron a un matraz volumétrico de 100 ml y se enrasó con tampón pH 4,5. Cada matraz se mantuvo bajo agitación magnética durante 10 minutos. Finalmente, todas las muestras se cuantificaron mediante espectroscopía UV-VIS a una longitud de onda de 266 nm. La cantidad de IND se determinó a partir de la recta de calibrado que se muestra en la figura 3.11.

Tabla 6.1: Resultados de cuantificación de IND.

	Método A (µg/ml)	Método B(µg/ml)
Muestra 1	16,47	19,11
Muestra 2	19,72	19,12
Muestra 3	19,04	21,06
Media ± sd	18,41 ±1,71	19,76 ±1,12

Los resultados de la cuantificación de IND en las tres muestras de los dos métodos diferentes de preparación, mortero (método A) y agitación magnética (método B) (tabla 6.1) mostraron una menor dispersión de los datos en la formulación hecha por agitación magnética, por lo tanto, el gel formado fue mucho más homogéneo.

En vista de estos resultados, el método de agitación magnética o Método B, ha sido seleccionado para preparar las formulaciones.

Se prepararon tres formulaciones, utilizando el método B.

A) El gel de IND materia prima, compuesto por IND, tampón pH 4,5 y la cantidad apropiada de polímero HPG para formar un gel al 1,75%.

B) El gel de dispersión sólida de IND, compuesto por la formulación, DS-1:0,12:5-NaOH, tampón pH 4,5 y la cantidad apropiada de HPG para formar un gel al 1,75%.

C) Gel de IND materia prima + 5% de Transcutol[®], que es el gel de IND con la adición de 5% de Transcutol[®] con el fin de mejorar la penetración del fármaco incorporando un promotor de la absorción transdérmica de las formulaciones tópicas.

Método de velocidad de disolución.

Ver el apartado 2 de esta tesis “Materiales y métodos”.

Estudio in vivo de biodisponibilidad tópica

Ver el apartado 2 de esta tesis “Materiales y métodos”.

Análisis estadístico de datos

Los resultados obtenidos de los ensayos de disolución de las diferentes formulaciones de IND se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la diferencia estadística mínima de Fisher (LSD) para comparaciones múltiples. Un valor de P inferior a 0,05 se consideró significativo ($P < 0,05$).

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Estudios de velocidad de disolución de geles tópicos de IND

Los perfiles de disolución del gel de IND materia prima, y el gel de DS-1:0,12:5-NaOH a pH 4,5 se ilustran en la figura 6.3.

Como se esperaba, no se alcanzó el 100% de IND disuelto, en ninguno de los geles y eso se debe a que el medio de disolución de pH que es un tampón de acetato de sodio / ácido acético glacial de pH 4,5, este valor de pH está cerca del valor pKa de IND (4,5); como consecuencia, el sistema está en una condición de sobresaturación y la solubilidad del fármaco es baja (Liu et al., 2013).

Se selecciona un pH de 4,5 para realizar los estudios de velocidad de disolución de los geles tópicos de IND por ser este pH cercano al pH de la piel, y además se ven mejor las diferencias entre la materia prima y la dispersión sólida.

El gel de IND materia prima, mostró una cantidad disuelta de fármaco del $5,35 \pm 1,14\%$ a los 120 min. Mientras que a ese mismo tiempo el gel de dispersión sólida DS-1:0,12:5-NaOH presentó disuelto casi el doble, $9,71 \pm 2,41\%$.

A las 24 horas el gel de IND materia prima presentó disuelto un $12,22 \pm 1,52\%$. Sin embargo, casi el doble, un $21,38 \pm 1,08\%$ de sustancia activa se disolvió con el gel de DS-1:0,12:5-NaOH.

Estas mejoras estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en el perfil de velocidad de disolución del gel de DS-1:0,12:5-NaOH respecto a el gel de IND materia prima, podrían suponer incrementos estadísticamente significativos ($P < 0,05$) en la absorción tópica de estas formulaciones en estudios *in vivo*.

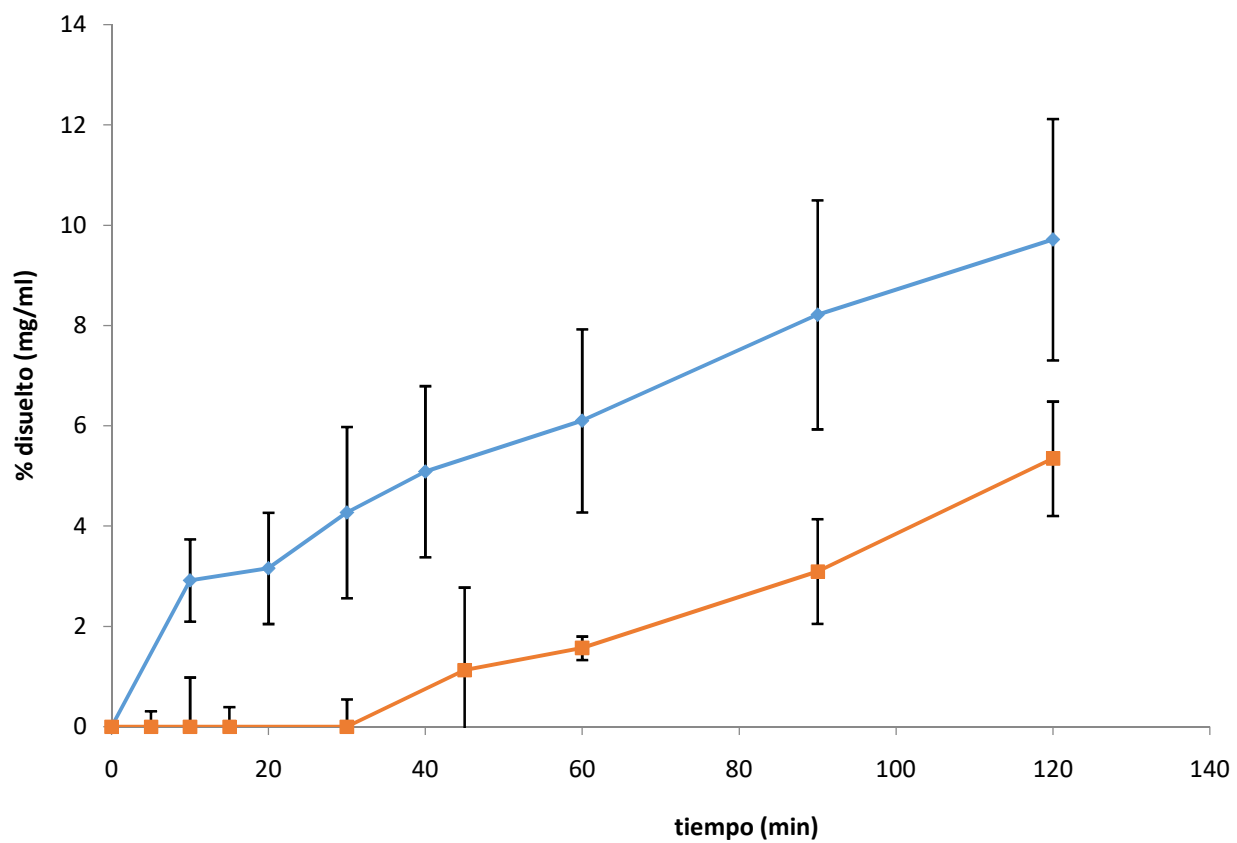


Figura 6.3: perfiles de disolución de un gel de IND materia prima (—) y un gel de DS-1:0,12:5-NaOH (—).

6.3.2. Estudios *in vivo* de biodisponibilidad tópica

El análisis de los resultados de absorción *in vivo* tras la administración tópica del gel de IND materia prima, demuestra un porcentaje de absorción creciente con el tiempo, desde un valor promedio de $18,76 \pm 7,79\%$, en los 8 voluntarios a los 10 minutos, hasta un valor medio de $75,29 \pm 3,97\%$ a los 60 min.

Así mismo, tras la administración de un gel de DS-1:0,12:5-NaOH se produce un incremento de la absorción al aumentar el tiempo, desde un valor promedio de $38,75 \pm 8,15\%$, en los 8 voluntarios a los 10 minutos, hasta un valor medio de $83,29 \pm 4,33\%$ a los 60 min.

Y lo mismo sucede tras la administración tópica de un gel de IND materia prima con Transcutol® al 5%, obteniéndose un valor medio de $23,23 \pm 8,14\%$, en los 8 voluntarios a los 10 minutos, hasta un valor promedio de $76,94 \pm 4,00\%$ a los 60 min.

La comparación de los resultados promedio obtenidos de los estudios de absorción *in vivo* en 8 voluntarios, demuestra que la incorporación de un promotor de absorción, Transcutol®, en la concentración del 5% a la formulación de gel de IND materia prima, aumenta significativamente ($P < 0,05$) la absorción del fármaco únicamente a los 30 minutos de aplicación respecto a la formulación de gel de IND materia prima sin Transcutol®, obteniéndose un porcentaje de absorción del $48,53 \pm 2,14\%$ después de la administración del gel de IND con Transcutol® y un $42,01 \pm 3,48\%$ después de la administración del gel de indometacina sola. Al resto de tiempos muestreados, no existen diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre el gel de IND con Transcutol® y el gel de IND sin Transcutol®.

En cambio se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre la absorción conseguida con el gel de DS-1:0,12:5-NaOH ($62,32 \pm 3,44\%$) respecto a la conseguida mediante la administración del gel de IND durante los primeros 30 minutos desde la administración del gel. A los tiempos de 40 ($71,38 \pm 6,32\%$ absorbido con la administración de la DS-1:0,12:5-NaOH y $56,85 \pm 7,95\%$ tras la administración del gel de IND) y 60 min ($83,29 \pm 4,33\%$ a partir del gel de DS-1:0,12:5-NaOH y un $75,29 \pm 3,97\%$ a partir del gel de IND),

no existen diferencias significativas ($P>0,05$) entre estas dos formulaciones. Esto mismo se observa cuando se comparan los porcentajes de fármaco absorbido después de la administración a partir del gel de DS, respecto al gel de IND materia prima con Transcutol®.

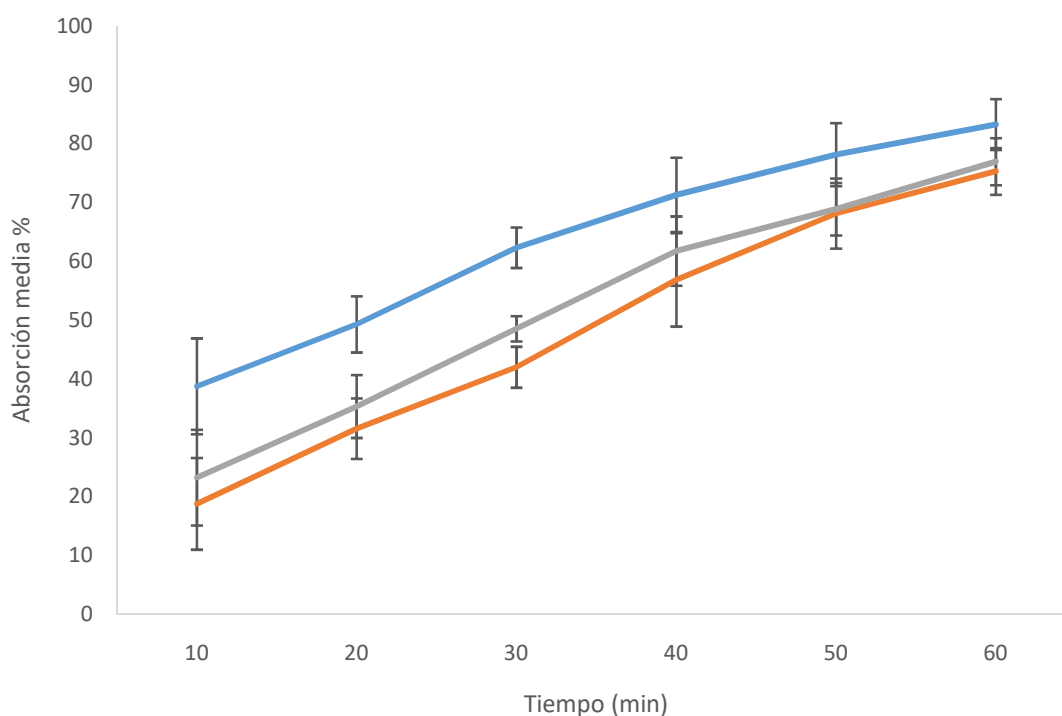


Figura 6.4: Absorción media de los diferentes geles de IND. — Gel de DS-1:0,12:5-NaOH, — gel de IND y Transcutol® al 5%, — gel de IND.

En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el gel de DS-1:0,12:5-NaOH, ha demostrado ser un buen recurso para mejorar la velocidad de disolución y la absorción transdérmica del fármaco.

La adición en las formulaciones de un promotor de absorción como es el Transcutol® no demostró una mejora significativa ($P>0,05$) para mejorar la absorción de geles IND a través de la piel.

En conclusión, los geles de HPG desarrollados utilizando DS de IND consideramos que son buenos candidatos para ser utilizados en el diseño de sistemas de administración transdérmica de IND.

6.4. Bibliografía

- Alexander, A., Dwivedi, S., Ajazuddin, Giri, T. K., Saraf, S., y Tripathi, D. K. (2012): "Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery", *Journal of Controlled Release*, 164, pp. 26-40.
- Badria, W., El Asbahanic, A., Miladia, K., Baraketd, A., Agustia, G., Nazarib, Q.A., Errachidd, A., Fessia, H., Elaissaria, A. (2018): "Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and Nigella Sativa L. essential oil for the topical treatment of inflammation" *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, pp. 234–242.
- Bannwarth, B. (2006): "Acetaminophen or NSAIDs for the treatment of osteoarthritis", *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 20, pp. 117–129
- Elsayed, M.M.A., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, N.M. (2007): "Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research", *Int. J. Pharm.*, 332, pp. 1-16,.
- Escobar, J.L., García, D.M., Zaldivar, D. e Katime, I. (2002): "Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos", *Revista Iberoamericana Polímeros*, 3 (3), pp. 1-25
- Grau M.V., Baron J.A., Langholz B., Karagas M., Greenberg E.R., Stukel T.A. y Mandel J.S. (2006): "Effect of NSAIDs on the recurrence of nonmelanoma skin cancer", *International Journal of Cancer*, 119, pp. 682–686.
- Hanifin, J.M., Cooper, K.D., Ho, V.C., Kang, S., Krafchik, B.R., Margolis, D.J., Schachner, L.A., Sidbury, R., Whitmore, S.E., Sieck, C.K., Van Voorhees, A.S. (2004): "Guidelines of care for atopic dermatitis", *J. Am. Acad. Dermatol.*, 50 (3), pp. 391-404.
- Hwa, C., Bauer, E.A., Cohen, D.E. (2011): "Skin biology", *Dermatol. Ther.*, 24, pp. 464-470.

- Kogan, A., Garti, N. (2006): "Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles" *Adv. Colloid Interface Sci.*, 123, pp. 369-385.
- Lichtenberger L.M., Phan T., Fang D. y Dial E.J. (2018): "Chemoprevention with phosphatidylcholine non-steroidal anti-inflammatory drugs *in vivo* and *in vitro*", *Oncology Letters*, 15(5), pp.6688–6694.
- Lin, S.Z., Wouessidjewe, D., Poelman, M.C. y Duchêne, D. /1994): "*In vivo* evaluation of indomethacin/ cyclodextrin complexes gastrointestinal tolerance and dermal antiinflammatory antiinflammatory activity", *Int. J. Pharm.* 106, pp. 63–67.
- Liu, P., De Wulf, O., Laru, J., Heikkilä, T., Van Veen, B.Kiesvaara, J Hirvonen,J Peltonen,1 L y Laaksonen T. (2013): "Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions". *AAPS PharmSciTech*, 14(2), pp. 748-756.
- Matsui, T., Amagai, M. (2015): "Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum", *Int. Immunol.*, 27 (6), pp. 269-280.
- Merino Pérez, J. y Noriega Borge, M.J. (2011): La piel: estructura y funciones", *Presentación de la asignatura Fisiología General*, Universidad de Cantabria, Cantabria.
- Moore, R.A., Tramer, M.R., Carroll, D., Wiffen, P.J. y McQuay, H.J. (1998): "Quantitive systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs" *BJM*, 316, pp. 333–338.
- Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y. N. y Guy, R. H. (2001): "Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52, pp. 103-112.
- Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., Yang, X. "Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs". *Int. J. Pharm.*, 353, pp. 270-276.
- Prausnitz, M.R. y Langer, R. (2008): "Transdermal drug delivery", *Nat. Biotechnol.*, 26, pp. 1261–1268.
- Sakdiseta, P., Amnuaikitb, T., Pichayakornb, W., Pinsuwanb, S. (2019): "Formulation development of ethosomes containing indomethacin for

transdermal delivery” Journal of Drug Delivery Science and Technology 52, pp. 760–768.

- Somasundaram R. y Herlyn M. (2014): “Indomethacin to the rescue of TRAIL-resistant melanomas”, Journal of Investigative Dermatology, 134(5), pp. 1198–1199.
- Stein, L.F., (2014): “Optimizing the use of topical agents in psoriasis”, Semin. Cutan. Med. Surg., 33, pp. 24-26.
- Vaile, J.H. y Davis, P. (1998): “Topical NSAIDs for musculoskeletal conditions”, Drugs, 56, pp. 783–799.
- Villarino N., Landoni.M. (2006): “Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica”, Analecta Veterinaria, 26 (1), pp. 28-37.
- Wollina, U. (2014): “Recent advances in the understanding and management of rosácea”, F1000 Prime Reports, 6, p. 50.
- World Health Organization, (2006), Who Press.

DISCUSIÓN FINAL

7.- Discusión final

Se han desarrollado nuevas formulaciones de IND para tratar de mejorar la velocidad de disolución de este fármaco y sus características biofarmacéuticas tanto por vía oral, como por vía tópica, mediante la preparación de DS por liofilización, utilizando como matriz polimérica la hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC) y como tensioactivo LSS.

Se estudió la humectabilidad de las diferentes formulaciones (IND pura, DS-1:0,12:0, DS-1:0,12:5, DS-1:0,12-20, DS-1:0,12:0-NaOH; DS-1:0,12:5-NaOH y DS-1:0,12:20-NaOH, MF-1:0,12:20 y MF-1: 0,12: 20-NaOH) mediante la determinación del ángulo de contacto de las mismas.

Se pudo observar que el ángulo de contacto del agua en las muestras comprimidas se fue reduciendo gradualmente a medida que pasaba el tiempo de 1s a 4s.

Este ángulo de contacto en los comprimidos de IND fue el más alto de todas las muestras estudiadas, lo que se atribuyó a la mayor hidrofobicidad de este fármaco.

Por otro lado, las MF obtuvieron valores de ángulo de contacto mucho más pequeños probablemente debido a su composición (L-HPC y LSS) que aumentaban su humectabilidad.

Las DS con mayor cantidad de L-HPC presentaron valores de ángulo de contacto mucho más pequeños que la MF con la misma relación IND: L-HPC, lo que puede deberse a un aumento en la humectabilidad de la formulación, después del proceso de liofilización.

Además, se observa que las DS sin matriz polimérica (DS-1:0,12:0 y DS-1:0,12:0-NaOH) tienen un ángulo de contacto mayor que las DS con L-HPC, una diferencia que aumenta con el aumento de la carga de L-HPC en la formulación, esto podría deberse a un aumento en la humectabilidad, debido a la L-HPC.

En vista de estos resultados, se podría concluir que existe una gran influencia del L-HPC en la humectabilidad de las muestras.

Las formulaciones elaboradas con NaOH, no presentan diferencias significativas ($P>0,05$) respecto a las formulaciones con las mismas cantidades de L-HPC elaboradas con tampón pH 8,4, por tanto se puede concluir que la humectabilidad de las formulaciones es independiente del método de elaboración.

Los estudios de velocidad de disolución se han llevado a cabo a tres pH diferentes (1,2; 4,5 y 6,8), por ser la IND un fármaco que presenta grandes cambios en su solubilidad durante su tránsito gastrointestinal.

Inicialmente, se estudió la velocidad de disolución de las diferentes formulaciones en fluido gástrico simulado sin enzimas (0,1 N HCl). Sin embargo, los resultados de velocidad de disolución mostraron una baja disolución del fármaco (inferior al 12,7%).

Debido a esto, se seleccionó el tampón fosfato a pH 6,8 como medio de disolución en nuestro método.

Sin embargo, a este pH (6,8) se produce una disolución tan rápida del fármaco que es imposible observar diferencias entre los perfiles de disolución de las diferentes DS. Por lo tanto, con el objetivo de obtener perfiles de disolución más lentos que permitan observar diferencias en las cantidades disueltas de fármaco entre las diferentes formulaciones, los ensayos de disolución también se realizaron a pH 4,5.

En los estudios de velocidad de disolución llevados a cabo en este pH, se observa que la incorporación de LSS en una determinada cantidad en la formulación produce un aumento en los perfiles de disolución de IND.

Además todas las DS mejoran significativamente ($P<0,05$) el perfil de disolución de la IND y de las respectivas MF.

Por otra parte, en este pH de 4,5, se observó que todas las DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH aumentan significativamente ($P<0,05$) la cantidad de IND disuelta en comparación con las DS con proporciones IND:LSS:L-HPC equivalentes elaboradas en medio tamponado de fosfato.

Como consecuencia de estos incrementos estadísticamente significativos en la velocidad de disolución podrían conllevar aumentos también significativos en la eficacia terapéutica de estas formulaciones. Por tanto, para la realización de los estudios *in vivo* se seleccionó la DS; DS-1:0,12:5-NaOH, ya que presenta el mejor perfil de disolución, aunque la DS-1:0,12:20-NaOH presenta una ligera mejora en el perfil de disolución, no existen diferencias significativas entre ellas ($P<0,05$) y por tanto se selecciona la formulación con menor cantidad de excipiente.

Con el fin de comprobar si se ha producido una alteración de la cristalinidad de la IND pura se emplearon diversas técnicas como: microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (XRPD), y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los resultados de SEM demuestran que la morfología original de todos los componentes desapareció en las DS, observándose únicamente una matriz que podría atribuirse a L-HPC y otros componentes de la formulación donde se encontraría el principio activo disperso de una manera uniforme.

Por otra parte, se observa que el tamaño de los poros de las DS elaboradas con una solución tamponada de fosfato es inferior al que presentan las correspondientes DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.

Estos resultados explican el incremento de los perfiles de disolución ($P<0,05$) hallados a partir de las DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH.

Tanto en las en las DS elaboradas con medio tamponado de fosfato como en las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH, se observa que el tamaño de los poros es mayor a medida que disminuye la cantidad de L-HPC.

En comparación con las DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH, en aquellas elaboradas con medio tamponado de fosfato, el proceso de liofilización es menos efectivo (poros más pequeños) y por tanto se necesitan mayores cantidades de L-HPC para conseguir mejores perfiles de velocidad de disolución. Esto mismo se observa en los ensayos de velocidad de disolución.

Así mismo, los resultados de XRPD demuestran que en todas las DS tanto elaboradas en una solución tamponada de fosfato como en las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH, se observa la desaparición de los picos característicos de la IND, lo que indica que el fármaco se encuentra en estado amorfo.

Por otra parte, se observó mediante los estudios de XRPD que el halo característico de la L-HPC, es mayor en las MF con respecto a las DS con la misma proporción IND:LSS:L-HPC. La menor cristalinidad en el halo atribuido a la L-HPC en las DS nos confirmó que el proceso de liofilización disminuye la cristalinidad de la matriz en nuestras formulaciones.

También los resultados de DSC muestran la transformación de la IND en su forma amorfa.

Además los resultados de DSC muestran una posible interacción sólido-sólido, sin implicar necesariamente una incompatibilidad farmacéutica, entre la L-HPC y la IND, ya que la MF-1:0,12:20-NaOH mostró un pico a 160,80° C (101,71 J / g) que puede ser correspondiente a la L-HPC, pero también coincide con el pico endotérmico característico de la IND.

Después de la caracterización de las formulaciones, se llevaron a cabo estudios *in vivo* de farmacocinética de la formulación seleccionada (DS-1:0,12:5-NaOH) en comparación con la IND. Tras la administración oral de 5 mg/kg de fármaco, las formulaciones presentan un perfil plasmático muy similar, aunque con la DS-1:0,12:5-NaOH se alcanza la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) más rápido y además es significativamente superior a la alcanzada con la IND a ese mismo tiempo ($P<0,05$). Como consecuencia con la DS se observó una distribución más rápida del fármaco en el torrente sanguíneo. En cambio la IND, tiene un perfil con una fase de absorción menos marcada y una fase de eliminación también más lenta.

El uso de una forma amorfa de medicamentos poco solubles en agua ha ampliado enormemente la ventana de rendimiento farmacocinético alcanzable. El perfil de disolución más lenta que presenta la IND, probablemente ha sido el

factor limitante de la absorción en estudios farmacocinéticos después de la administración oral de IND.

Sin embargo, a partir de los 90 min no se observan diferencias significativas en el perfil farmacocinético de ambas formulaciones ($P>0,05$).

Los valores de AUC de la sustancia activa fueron significativamente superiores ($P<0,05$) tras la administración oral de DS-1:0,12:5-NaOH frente a los observados tras la administración de IND. Esto es debido, probablemente al estado amorfo en el que se encuentra el fármaco, como se ha podido comprobar en los ensayos de DSC y XRPD. Por otra parte, también ha podido influir el efecto producido por la L-HPC para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles, como la IND.

Las concentraciones plasmáticas de este fármaco en ambas formulaciones (IND materia prima y DS) presentaron una alta variabilidad después de su administración oral. En este estudio, la baja solubilidad del fármaco ha limitado su absorción y cinética después de la administración oral bajo estas formas de dosificación.

Los resultados farmacocinéticos obtenidos pueden verse influidos por los excipientes utilizados y el proceso de preparación de las formulaciones. El proceso de liofilización y la L-HPC utilizada como excipiente, aumentaron la solubilidad de IND, y también de esta forma mejoraron los valores farmacocinéticos y biofarmacéuticos de la DS.

Así mismo, se llevaron a cabo estudios de velocidad de disolución de un gel tópico de IND materia prima y otro de DS-1:0,12:5-NaOH, a pH 4,5 por ser este pH cercano al pH de la piel, y además se discriminan mejor las diferencias entre la IND materia prima y la DS.

Como se esperaba, no se alcanzó el 100% de IND disuelto, en ninguno de los geles y eso se debe a que el medio de disolución de pH es un tampón de acetato de sodio / ácido acético glacial de pH 4,5, valor que se encuentra cerca del valor de pKa del fármaco (4,5); como consecuencia, el sistema se encuentra en condiciones de sobresaturación y la solubilidad del fármaco es baja.

Se observaron incrementos estadísticamente significativos ($P<0,05$) en el perfil de velocidad de disolución del gel de DS-1:0,12:5-NaOH respecto al gel de IND pura, que podrían suponer incrementos estadísticamente significativos ($P<0,05$) en la absorción tópica de estas formulaciones en estudios *in vivo*.

Para confirmar estos resultados, se llevaron a cabo estudios de absorción *in vivo* en voluntarios sanos tras la administración tópica de varias formulaciones: un gel de IND, un gel de IND con Transcutol® al 5% y un gel de DS-1:0,12:5-NaOH.

En estos estudios se observó una absorción creciente de IND a medida que pasaba el tiempo.

La comparación de los resultados promedio obtenidos de los estudios de absorción *in vivo* en 8 voluntarios, demostró que la incorporación de un promotor de absorción, Transcutol®, a la concentración del 5% en la formulación de gel de IND pura, aumentaba significativamente ($P<0,05$) la absorción del fármaco únicamente a los 30 minutos de aplicación respecto a la formulación de gel de IND sin Transcutol®. Al resto de tiempos, no existen diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) entre el gel de IND con Transcutol® y el gel de IND sin Transcutol®.

En cambio se observan diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) entre la absorción conseguida con el gel de DS-1:0,12:5-NaOH respecto a la conseguida mediante la administración del gel de IND durante los primeros 30 minutos desde la administración del gel. A los tiempos de 40 y 60 min no existen diferencias significativas ($P>0,05$) entre estas dos formulaciones. Esto mismo se observa cuando se comparan los porcentajes de fármaco absorbido después de la administración a partir del gel de DS, respecto al gel de IND con Transcutol®.

En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el gel de DS-1:0,12:5-NaOH, ha demostrado ser un buen recurso para mejorar la velocidad de disolución y la absorción transdérmica del fármaco, a tiempos cortos, lo cual puede ser beneficioso para el tratamiento rápido del dolor agudo.

La adición en las formulaciones de un promotor de absorción como es el Transcutol[®] no demostró una mejoría significativa ($P>0,05$) para incrementar la absorción de geles de IND a través de la piel.

En conclusión, consideramos que los geles con el polímero HPG desarrollados utilizando DS de IND son buenos candidatos para ser utilizados en el diseño de sistemas de administración transdérmica de IND.

CONCLUSIONES

8.- Conclusiones

Se han conseguido los objetivos propuestos para la realización de esta tesis y a partir de ellos hemos llegado a estas conclusiones:

1.- Las DS elaboradas con mayor cantidad de L-HPC presentan valores de ángulo de contacto muy inferiores a la mezcla física con la misma relación IND: L-HPC, lo que puede ser atribuido a un aumento en la humectabilidad de la formulación, tras el proceso de liofilización.

2.- Los resultados de SEM de las DS demuestran que como se esperaba tras el proceso de liofilización, la morfología original de todos los componentes desaparece, observándose únicamente una matriz que se atribuye a L-HPC y otros componentes de la formulación donde se encuentra la IND dispersa de una manera uniforme. El tamaño de los poros de las dispersiones elaboradas con una solución tampón fosfato es inferior a los hallados en las DS elaboradas en agua alcalinizada con NaOH. Con ambos tipos de DS el tamaño de los poros disminuía a medida que se aumentaba la cantidad de L-HPC.

3.- Los resultados de XRPD y DSC demuestran que en todas las DS tanto en las elaboradas en solución tamponada de fosfato como en las elaboradas en agua alcalinizada con NaOH, se observa la desaparición de los picos característicos de la IND, lo que indica que el fármaco se encuentra en su estado amorfo.

4.- A lo largo de la tesis se han llevado a cabo distintos ensayos de velocidad de disolución a pH 1,2; 6,8 y 4,5 teniendo en cuenta el tránsito gastro-intestinal y las características físico-químicas de la IND. La adición de una determinada cantidad, en concentraciones no tóxicas, de LSS a las formulaciones produce un aumento en la velocidad de disolución del fármaco. Con el fin de apreciar diferencias significativas en la disolución de la IND, se seleccionó el pH 4,5. Se observó que las DS elaboradas en agua alcalinizada con hidróxido sódico mostraban los mejores perfiles de disolución con todas las proporciones

estudiadas de IND:L-HPC, en comparación con las otras dispersiones elaboradas con tampón fosfato. Las formulaciones DS-1:0,12:5-NaOH y DS-1:0,12:20-NaOH obtuvieron los mejores perfiles de disolución, no existen diferencias significativas entre ellas ($P<0,05$) y por tanto se selecciona la formulación con menor cantidad de excipientes para la realización de los estudios de biodisponibilidad oral y tópica.

6.- Tras la administración oral de 5 mg/kg de fármaco en un modelo animal, las formulaciones presentan un perfil plasmático muy similar, con una alta variabilidad debido a la poca solubilidad de la IND, aunque con la DS-1:0,12:5-NaOH se alcanza la concentración máxima más rápido y además es significativamente superior a la alcanzada con la IND materia prima a ese mismo tiempo ($P<0,05$).

7.- Los estudios farmacocinéticos llevados a cabo en ratas (administración oral de 5 mg/kg), demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) entre las AUC totales de la DS-1:0,12:5-NaOH y de la IND materia prima, lo que demuestra la mejor biodisponibilidad oral de la dispersión sólida seleccionada.

8.- En cuanto a los resultados de vía transdérmica, tanto los perfiles de disolución *in vitro* y de biodisponibilidad tópica en voluntarios sanos, obtenidos para la IND nos permiten considerar que el gel de DS-1:0,12:5-NaOH, ha demostrado ser un buen candidato para mejorar la velocidad de disolución y la absorción transdérmica de este fármaco. La adición de Transcutol®, un promotor de absorción, no mostró un incremento significativo ($P>0,05$) en la absorción tópica de IND a partir de geles de IND materia prima.

9.- Finalmente, consideramos que los geles de HPG elaborados con DS de IND (DS-1:0,12:5-NaOH) son buenos candidatos para ser empleados en un futuro en el diseño de sistemas de administración transdérmica de IND.

BIBLIOGRAFÍA

9.- Bibliografía

- Adebisi, A.O., Kaialy, W., Hussain, T., Al-Hamidi, H. y Asare-Addo, K. (2016): "Solid-state, triboelectrostatic and dissolution characteristics of spray-dried piroxicam-glucosamine solid dispersions", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, pp. 841-851.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2015). *Real Farmacopea Española (RFE)*. 5ª ed.Madrid.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2016). *Prospecto Reusin®*. Madrid.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2017). *Ficha técnica Inacid®*. Madrid.
- Alexander, A., Dwivedi, S., Ajazuddin, Giri, T. K., Saraf, S., y Tripathi, D. K. (2012): "Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery", *Journal of Controlled Release*, 164, pp. 26-40.
- Alvarez-Lorenzo, C., Gómez- Amoza, J.L., Martínez-Pacheco, R., Souto, C., Concheiro A. (2000): "Evaluation of low-substituted hydroxypropylcelluloses (L-HPCs) as fillerbinders for direct compression", *International Journal of Pharmaceutics*, 197(1–2), pp. 107-116.
- Ambike, A.A., Mahadik, K.R. y Paradkar, A. (2004): "Stability study of amorphous valdecoxib", *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1-2), pp. 151-162.
- Attia, M.A.; Aboutaleb, A.E.; Habib, F.S. (1982): "A study on the dissolution of diazepam from its solid dispersiones and coprecipitates in

- the presence of various concentrations of non-ionic surfactants”, *Pharmazie*, 37, pp. 274-77.
- Badawi, A.A., El-Sayed, A.A. (1980), *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5, pp. 492-497.
 - Badria, W., El Asbahanic, A., Miladia, K., Baraketd, A., Agustia, G., Nazarib, Q.A., Errachidd, A., Fessia, H., Elaissaria, A. (2018): “Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa* L. essential oil for the topical treatment of inflammation” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, pp. 234–242.
 - Bakatselou, V., Oppenheim, R.C. y Dressman, J.B. (1991): “Solubilization and wetting effects of bile salts on the dissolution of steroids”, *Pharmaceutical Research*, 8, pp. 1461-1469.
 - Bannow J, Benjamins JW, Wohler J, Löbmann K, Svagan AJ. Solid nanofoams based on cellulose nanofibers and indomethacin-the effect of processing parameters and drug content on material structure. *Int J Pharm* 2017;526(1-2), pp. 291-299.
 - Bannwarth, B. (2006): “Acetaminophen or NSAIDs for the treatment of osteoarthritis”, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 20, pp. 117–129
 - Betageri G.V. y Makarla K.R. (1995): “Enhancement of dissolution of glyburide by solid dispersion and lyophilization techniques”, *International Journal of Pharmaceutics*, 126, pp. 155-60.
 - Bjarnason, I., Scarpignato, C., Holmgren, E., Olszewski, M., Rainsford, K.D. y Lanas, A. (2018): “Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs”, *Gastroenterology*, 154(3), pp. 500-514.
 - Bodenlenz, M., Tiffner, K.I., Raml, R., Augustin, T., Dragatin, C., Birngruber, T., Schimek, D., Schwagerle, G., Pieber, T.R., Raney, S.G., Kanfer, I. y Sinner, F., (2017): “Open flow microperfusion as a dermal pharmacokinetic approach to evaluate topical bioequivalence”, *Clinical Pharmacokinetics*, 56, pp. 91–98.
 - Brunton L.L. (Ed.). (2011). *Goodman & Gilman: Bases farmacológicas de la terapéutica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.L., Madrid.

- Bustamante Martínez, P. y Guzmán Navarro, M. (1997). “Disoluciones”, en J.L. Vila Jato, *Tecnología Farmacéutica*. Madrid. Síntesis, 143-205.
- Cattani, V.B., Pohlmann, A.R., Dalla Costaa, T. (2008): “Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules”, *International Journal of Pharmaceutics*, 363, pp. 214–216
- Cattania, V.B., Pohlmann, A.R., Dalla-Costa, T. (2008): “Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules”, *Int J Pharm*, 363, pp. 214–216.
- Chen, A. Z., Li, Y., Chay, F. T., Lau, T. Y., Hu, J.Y., Zhao, Z. y Mok, D. K. (2009): “Microencapsulation of puerarin nanoparticles by poly(L-lactide) n a supercritical CO2 process”, *Acta Biomaterialia*, 12, pp. 26-32.
- Chiou, W.L. y Riegelman S. (1969): “Preparation and dissolution characteristics of several fast-release solid dispersions of griseofulvin”, *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 58(12), pp. 1505-1510.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (2017). Portalfarma. Disponible en: <https://www.portalfarma.com/Profesionales/DestacadosProfesionales/Paginas/Interacciones-Medicamentos.aspx> [Consultado 17-12-2018].
- Dahlberg. C., Millqvist-Fureby, A., Schuleit, M. y Furó, I. (2010): “Polymer-drug interactions and wetting of solid dispersions”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(1-3), pp. 125-33.
- de la Torre-Iglesias, P.M., García-Rodríguez, J.J., Torrado-Durán, G., Torrado-Durán. S., Torrado-Santiago, S. y Bolás-Fernández, F. (2014): “Enhanced bioavailability and anthelmintic efficacy of mebendazole in redispersible microparticles with low-substituted hydroxypropylcellulose”, *Drug Design, Development and Therapy*, 8, pp. 1467-1479.
- Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Harris, D., Beck, T.N.C. (2001): “The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles”, *Polymer*, 42, pp.261-272.
- Dharmalingam K, Anandalakshmi R. (2019): “Fabrication, characterization and drug loading efficiency of citric acid crosslinked

- NaCMC-HPMC hydrogel films for wound healing drug delivery applications". *Int J Biol Macromol*, (134), pp. 815-829.
- DiNunzio, J.C., Brough, C., Miller, D.A., Williams R.O. y McGinity, J.W. (2010): "Applications of KinetiSol dispersing for the production of plasticizer free amorphous solid dispersions", *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 40, pp. 179-187.
 - Dong, Z., Chatterji, A., Sandhu, H., Choi, D.S., Chokshi, H. y Shah N. (2008): "Evaluation of solid state properties of solid dispersions prepared by hot-melt extrusion and solvent co-precipitation" *International Journal of Pharmaceutics*, 355(1-2), pp. 141-149.
 - Draguet-Brughmans, M., Azibi, M. y Bouche, R. (1979): "Solubilité et vitesse de dissolution du meprobamate; des cas significatifs", *Journal de pharmacie de Belgique*, 34, pp. 267-271.
 - Dreischulte, T., Morales, D.R., Bell, S. y Guthrie, B. (2015): "Combined use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with diuretics and/or renin-angiotensin system inhibitors in the community increases the risk of acute kidney injury", *Kidney International*, 88(2), pp. 396-403.
 - EcuRed (2018): *Microscopio electrónico*. Disponible en: https://www.ecured.cu/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_barrido. [Consulta: 19 de marzo de 2019].
 - El-Badry, M., Fetih, G. y Fathy, M. (2009): "Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG4000", *Saudi Pharmaceutical Journal*, 17(3), pp. 217-225.
 - El-Egakey, M.A., Soliva, M. y Speiser, P. (1971): "Hot extruded dosage forms. I. Technology and dissolution kinetics of polymeric matrices", *Pharm. Acta Helv.*, 46, pp. 31-52.
 - El-Sabawi, D., Hamdan, I.I. (2014): "Improvement of dissolution rate of gliclazide through sodium salt formation", *Dissolution Technologies*, 21(4), pp. 49-55.

- Elsayed, M.M.A., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., Khalafallah, N.M. (2007): “Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research”, *Int. J. Pharm.*, 332, pp. 1-16,.
- El-Yazbi, A.F., Eid, A.H. y El-Mas M.M. (2018): “Cardiovascular and renal interactions between cyclosporine and NSAIDs: Underlying mechanisms and clinical relevance”, *Pharmacological Research*, 129, pp. 251-261.
- Escobar, J.L., García, D.M., Zaldivar, D. e Katime, I. (2002): “Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos”, *Revista Iberoamericana Polímeros*, 3 (3), pp. 1-25
- Farrell R.E. (2010): *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization.*, Estados Unidos: Academic Press.
- Fitriani, L., Haqi, A. y Zaini, E. (2016): “Preparation and characterization of solid dispersion freeze-dried efavirenz - polyvinylpyrrolidone K-30”, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 7(3), pp. 105-109.
- Gallagher, P.M., Coffey, M.P., Krukonis, V.J., Klasutis, N. (1989): “Gas antisolvent recrystallization: new process to recrystallize compounds insoluble in supercritical fluids”, en *Supercritical fluid science and technology*, ACS Symposium, American chemical society, Washington, J.M.L. Penniger.
- Gaoa, N., Guob, M., Fub, Q. y Heb, Z. (2017): “Application of hot melt extrusion to enhance the dissolution and oral bioavailability of oleanolic acid”, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(1), pp. 66-72.
- García-Herrero, V., Torrado, C., García-Rodríguez, J.J., López-Sánchez, A., Torrado, S. y Torrado-Santiago, S. (2017): “Improvement of the surface hydrophilic properties of naproxen particles with addition of hydroxypropylmethyl cellulose and sodium dodecyl sulphate: *In vitro* and *in vivo* studies”, *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1-2), pp. 381-90.
- García-Rodríguez, J.J., de la Torre-Iglesias, P.M., Vegas-Sánchez, M.C., Torrado-Durán, S., Bolás-Fernández, F. y Torrado-Santiago, S. (2011):

- “Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: Improved anthelmintic activity”, *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), pp. 23-28.
- Garidel, P., Pevestorf, B., Bahrenburg, S. (2015) “Stability of buffer-free freeze-dried formulations: A feasibility study of a monoclonal antibody at high protein concentrations” *Eur J Pharm Biopharm*, 97, pp.125-139.
 - Gennaro, A. R. (Ed.). (2003): Remington: farmacia, Madrid, Panamericana.
 - Ghaderi, R., Artursson, P. y Carlfors, J. (1999): “Preparation of biodegradable microparticles using solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS),” *Pharmaceutical Research*, 16(5), pp. 676-681.
 - Gómez-Burgaz, M., Torrado, G., Torrado y S. (2009): “Characterization and superficial transformations on mini-matrices made of interpolymer complexes of chitosan and carboxymethylcellulose during *in vitro* clarithromycin release”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73(1), pp. 130-139.
 - Grau M.V., Baron J.A., Langholz B., Karagas M., Greenberg E.R., Stukel T.A. y Mandel J.S. (2006): “Effect of NSAIDs on the recurrence of nonmelanoma skin cancer”, *International Journal of Cancer*, 119, pp. 682–686.
 - Groenewoud, W. M. (2001): *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*, Estados Unidos, Elsevier.
 - Gulsun, T., Ozturk, N., Kaynak, M.S., Vural, I., Sahin, S. (2017): “Preparation and evaluation of furosemide containing orally disintegrating tablets by direct compression”, *Pharmazie*, 72(7), pp. 389-394.
 - Guo, J.H., Skinner, G.W., Harcum, W.W. y Barnum, P.E. (1998): “Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers”, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(6), pp 254-261.
 - Hanifin, J.M., Cooper, K.D., Ho, V.C., Kang, S., Krafchik, B.R., Margolis, D.J., Schachner, L.A., Sidbury, R., Whitmore, S.E., Sieck, C.K., Van

- Voorhees, A.S. (2004): "Guidelines of care for atopic dermatitis", J. Am. Acad. Dermatol., 50 (3), pp. 391-404.
- Helmy, M.W., Helmy, M.M., El-Mas, M.M. (2018): "Enhanced lipoxxygenase/LTD4 signaling accounts for the exaggerated hypertensive and nephrotoxic effects of cyclosporine plus indomethacin in rats", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, pp. 309-316.
 - Herbrink, M., Schellens, J.H.M. y Beijnen, J.H. (2017): "Bastiaan Nuijen Improving the solubility of nilotinib through novel spray-dried solid dispersions", *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1–2), pp. 294-302.
 - Holm, P., Buur, A., Elema, M., Møllgaard, B., Holm, J. y Schult, K. (2007): "Controlled agglomeration", US Patent 7217431.
 - Hu, X.Y., Lou, H. y Hageman M. (2018): "Preparation of lapatinib ditosylate solid dispersions using solvent rotary evaporation and hot melt extrusion for solubility and dissolution enhancement", *International Journal of Pharmaceutics*, 552(1–2), pp. 154-163.
 - Hughey, J.R., Keen, J.M., Miller, D.A., Brough, C. y McGinity J.W. (2012): "Preparation and characterization of fusion processed solid dispersions containing a viscous thermally labile polymeric carrier", *International Journal of Pharmaceutics*, 438, pp. 11-19.
 - Hwa, C., Bauer, E.A., Cohen, D.E. (2011): "Skin biology", *Dermatol. Ther.*, 24, pp. 464-470.
 - International Conference of Harmonisation (2005): ICH Q2 (R1): *Validación de métodos analíticos*.
 - Kanaujia, P., Lau, G., Ng, W.K., Widjaja, E., Hanefeld, A., Fischbach, M., Maio, M. y Tan, R.B. (2011): "Nanoparticle formation and growth during *in vitro* dissolution of ketoconazole solid dispersión", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, pp. 2876–2885.
 - Karanth, H., Shenoy, V. S. y Murthy, R. R. (2006): "Industrially feasible alternative approaches in the manufacture of solid dispersions: A technical report", *AAPS PharmSciTech.*, 7(4), pp. 31-38.
 - Karata, A. Yüksel, N. y Baykara, T. (2005): "Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol", *Il Farmaco*, 60, pp. 777–782.

- Karavas, E., Ktistis, G., Xenakis, A., Georgarakis, E. (2006): "Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63(2), pp. 103-114.
- Kaschak, T., Boyd, D. y Yan B. (2011): "Characterization of glycation in an IgG1 by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate and mass spectrometry", *Analytical Biochemistry*, 417(2), pp. 256-263.
- Kawabata, Y., Yamamoto, K., Debari, K., Onoue, S. y Yamada, S. (2010): "Novel crystalline solid dispersion of tranilast with high photostability and improved oral bioavailability", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(4), pp. 256-262.
- Kawashima, Y., Takeuchi, H., Hino, T., Niwa, T., Lin, T.L., Sekigawa, F. y Ohia M. (1993): "The effects of particle size, degree of hydroxypropyl substitution and moisture content of low-substituted hydroxypropylcellulose on the compactability of acetaminophen and the drug release rate of the resultant tablets", *STP pharma sciences*, 3, pp. 170-177.
- Kia-Ki, H., Richard, C., Gui-Yi, Z. y Delacourte, A. (1986): "Sequence homology analysis of proteins by chemical cleavages: Using a mono and two dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis", *International Journal of Biochemistry*, 18(12), pp. 1073-1082.
- Kitagawa, H., Saito, H. (1978): "General pharmacology of hydroxypropylcellulose of low substitution (L-HPC)", *Pharmacometrics*, 16, pp. 299–302.
- Kitagawa, H., Saito, H., Yokoshima, T. (1976): "Absorption, distribution, excretion and metabolism of ¹⁴C-hydroxypropylcellulose of low-substitution", *Pharmacometrics*, 12, pp. 33–39.
- Kiyose, M., Yamamoto, E., Yamane, C., Midorikawa, T., Takahashi, T. (2007): "Structure and Properties of Low-Substituted Hydroxypropylcellulose Films and Fibers Regenerated from Aqueous Sodium Hydroxide Solution", *Polymer Journal*; 39, pp. 703–711.

- Kleinebudde, P. (1993): "Application of low substituted hydroxypropylcellulose (L-HPC) in the production of pellets using extrusion/spheronization", *International Journal of Pharmaceutics*, 96, (1–3), pp. 119-128.
- Kogan, A., Garti, N. (2006): "Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles" *Adv. Colloid Interface Sci.*, 123, pp. 369-385.
- Krukonis, V. (1984): "Supercritical fluid nucleation of difficult-to-comminute solids", en *AiChE Annual Meeting*, San Francisco.
- Kubota, K., Kobayashi, N., Yabuta, M., Ohara, M. y Otsuka, K. (2017): "Identification and characterization of a thermally cleaved fragment of monoclonal antibody-A detected by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 140, pp. 98-104.
- Lee, M.C., Wu, K.S., Nguyen, T.N. y Sun B. (2014): "Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for direct quantitation of protein adsorption", *Analytical Biochemistry*, 465, pp. 102-104
- Lehman, P.A., Raney, S.G., Franz, T.J., (2011): "Percutaneous absorption in man: *in vitro*- *in vivo* correlation", *Skin Pharmacology and Physiology*, 24, pp. 224-230.
- Lichtenberger L.M., Phan T., Fang D. y Dial E.J. (2018): "Chemoprevention with phosphatidylcholine non-steroidal anti-inflammatory drugs *in vivo* and *in vitro*", *Oncology Letters*, 15(5), pp.6688–6694.
- Lin, S.Z., Wouessidjewe, D., Poelman, M.C. y Duchêne, D. /1994): "*In vivo* evaluation of indomethacin/ cyclodextrin complexes gastrointestinal tolerance and dermal antiinflammatory antiinflammatory activity", *Int. J. Pharm.* 106, pp. 63–67.
- Liu, P., De Wulf, O., Laru, J., Heikkilä, T., Van Veen, B.Kiesvaara, J Hirvonen,J Peltonen,1 L y Laaksonen T. (2013): "Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions". *AAPS PharmSciTech*, 14(2), pp. 748-756.

- Löbmann K, Wohler J, Müllertz A, Wågberg L, Svagan AJ. Indomethacin: Cellulose nanopaper and nanofoam for patient-tailored drug delivery. *Adv Mater Interfaces* 2017; 9(4).
- Lokamatha, K.M., Shanta Kumar, S.M. y Rao, R. (2011): "Enhancement of solubility and dissolution rate of nevirapine by solid dispersión technique using dextran: preparation and *in vitro* evaluation", *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 2(12), pp. 1-8.
- Majerik, V., Charbit, G., Badens, E., Horváth, G., Szokonya, L., Bosc, N. y Teillaud, E. (2007) "Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation", *The Journal of Supercritic Fluids*, 40, pp. 101–110.
- Mann, A.K.P., Schenck, L., Koynov, A., Rumondor, A.C.F., Jin, X., Marota, M., Dalton, C. (2018): "Producing Amorphous Solid Dispersions via Co-Precipitation and Spray Drying: Impact to Physicochemical and Biopharmaceutical Properties", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(1), pp. 183-191.
- Matsui, T., Amagai, M. (2015): "Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum", *Int. Immunol.*, 27 (6), pp. 269-280.
- Merino Pérez, J. y Noriega Borge, M.J. (2011): *La piel: estructura y funciones*, Presentación de la asignatura Fisiología General, Universidad de Cantabria, Cantabria.
- Mettler Toledo (2018): *Calorímetro diferencial de barrido*. Disponible en: https://www.mt.com/mx/es/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/TA_Family_Browse/HP_DSC.html. [Consulta: 21 de marzo de 2019].
- Montes Ruiz-Cabello, F.J. (2009): *Efecto de la rugosidad y heterogeneidad superficial en fenómenos de mojado*, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Facultad de Farmacia. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/18197759>. [Consulta: 29 de mayo de 2019].
- Moore, R.A., Tramer, M.R., Carroll, D., Wiffen, P.J. y McQuay, H.J. (1998): "Quantitive systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs" *BJM*, 316, pp. 333–338.

- Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y. N. y Guy, R. H. (2001): "Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 52, pp. 103-112.
- Motallae, S., Taheri, A. y Homayouni A. (2018): "Preparation and characterization of solid dispersions of celecoxib obtained by spray-drying ethanolic suspensions containing PVP-K30 or isomalt", Journal of Drug Delivery Science and Technology, 46, pp. 188-196.
- Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., Yang, X. "Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs". Int. J. Pharm., 353, pp. 270-276.
- Oishi, T.S., Haque, M.A., Dewan, I. y Islam, S.M.A. (2011): "Comparative *in vitro* dissolution study of some ciprofloxacin generic tablets under biowaiver conditions by RP-HPLC", International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2(12), pp. 3129-3135.
- Palmeiro-Roldán, R., Fonseca-Berzal, C., Gómez-Barrio, A., Arán, V.J., Escario, J.A., Torrado-Durán, S, Torrado-Santiago S. (2014): "Development of novel benznidazole formulations: physicochemical characterization and *in vivo* evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease". Int J Pharm, 472(1-2), pp. 110-7.
- Pani, N.R., Nath, L.K., Acharya, S., Bhuniya, B. (2012): "Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients", J Therm Anal Calorim, 108, pp. 219–226.
- Pokharkar, V. B., Mandpe, L. P., Padamwar, M. N., Ambike, A. A., Mahadik, K. R. y Paradkar, A. (2006): "Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug", Powder Technology, 167(1), pp. 20-25.
- Prabhu, S. Ortega, M. y Ma, C. (2005): "Novel lipidbased formulations enhancing the *in vitro* and permeability characteristics of a poorly watersoluble model drug, piroxicam", International Journal of Pharmaceutics, 301(1-2), pp. 209-216.

- Pralhad, T. y Rajendrakumar, K. (2004): "Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(2), pp. 333-339.
- Prausnitz, M.R. y Langer, R. (2008): "Transdermal drug delivery", *Nat. Biotechnol.*, 26, pp. 1261–1268.
- Qi, S., Gryczke, A., Belton, P. y Craig D.Q. (2008): "Characterisation of solid dispersions of paracetamol and EUDRAGIT® E prepared by hot-melt extrusion using thermal, microthermal and spectroscopic analysis", *International Journal of Pharmaceutis*, 354, pp. 158-167.
- Quintena, T., Gonnissena, Y., Adriaensa, E., De Beera, T., Cnuddeb V., Masschaeleb B., Van Hoorebekeb, L., Siepmannc, J., Remona, J.P. y Vervaeta, C. (2009): "Development of injection moulded matrix tablets based on mixtures of ethylcellulose and low-substituted hydroxypropylcellulose", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3–4), pp. 207-216.
- Raney, S.G., Franz, T.J., Lehman, P.A., Lionberger, R., y Chen, M.L., (2015): "Pharmacokinetics-based approaches for bioequivalence evaluation of topical dermatological drug products", *Clinical Pharmacokinetics*, 54, pp. 1095–1106.
- Rojas-Oviedo, I., Retchkiman-Corona, B., Quirino-Barreda, C.T., Cárdenas, J. y Schabes-Retchkiman, PS. (2012): "Solubility enhancement of a poorly water soluble drug by forming solid dispersions using mechanochemical activation", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(6), pp. 505-511.
- Rosenberg, J. y Breitenbach, J. (1998): "The production of active substance compositions in the form of a solid solution of the active substance in a polymer matrix, and active substance compositions produced by this process". US Patent 5741519.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J. y Quinn, M.E. (2006): *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6ª ed. Londres: Pharmaceutical Press.

- Saeedi, M., Akbari, J., Morteza-Semnani, K., Enayati-Fard, R., Sar-Reshteh-Dar, S. y Soleymani, A. (2011): "Enhancement of dissolution rate of indomethacin using liquisolid compacts", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), pp. 25-34.
- Sakdiseta, P., Amnuaikitb, T., Pichayakornb, W., Pinsuwanb, S. (2019): "Formulation development of ethosomes containing indomethacin for transdermal delivery" *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 52, pp. 760–768.
- Sarode, A.L., Malekar, S.A., Cote, C., Worthen, D.R. (2014): "Hydroxypropyl cellulose stabilizes amorphous solid dispersions of the poorly water soluble drug felodipine", *Carbohydr Polym*, 112, pp. 512-9.
- Sekiguchi, K. y Obi, N. (1961): "Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 9, pp. 866-872.
- Sekiguchi, K. y Obi, N. (1964): "Studies on absorption of eutectic mixture. II. Absorption of fused conglomerates of chloramphenicol and urea in rabbits", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 12, pp. 134–144.
- Semjonov, K., Kogermann, K., Laidmäe, I., Antikainen, O., Strachan, C.J., Ehlers, H., Yliruusi, J. y Heinämäki, J. (2016): "The formation and physical stability of two-phase solid dispersion systems of indomethacin in supercooled molten mixtures with different matrix formers", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, pp. 237-46.
- Sethia, S. y Squillante, E. (2002): "Physicochemical characterization of solid dispersions of carbamazepine formulated by supercritical carbon dioxide and conventional solvent evaporation method", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, pp. 1948–1957.
- Shah, V.P., Maibach, H.I., Jenner, J. (Eds.). (2015): *Topical Drug Bioavailability Bioequivalence and Penetration*, Berlín, Springer.

- Shristi B., Neha J., Indu B.P. y Rajesh G. (2012): "A review on some Indian medicinal plants for antiulcer activity", *Journal of Scientific Research on Pharmacy*, 1, pp. 6–9.
- Simonelli, A., Mehta, S.C., Higuchi y W.I. (1969): "Dissolution rates of high energy polyvinylpyrrolidone (PVP)-sulfathiazole coprecipitates", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, pp. 538-549.
- Smith J. B. y Willis A. L. (1971): "Aspirin Selectively inhibits prostaglandin production in human platelets", *Nature New Biology*, 231, pp. 235-237.
- Somasundaram R. y Herlyn M. (2014): "Indomethacin to the rescue of TRAIL-resistant melanomas", *Journal of Investigative Dermatology*, 134(5), pp. 1198–1199.
- Stein, L.F., (2014): "Optimizing the use of topical agents in psoriasis", *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 33, pp. 24-26.
- Stuart, A.V., Zuo, J. y Löbenberg, R. (2014): "Investigating the dissolution profiles of amoxicillin, metronidazole, and zidovudine formulations used in Trinidad and Tobago, West Indies", *AAPS PharmSciTech*, 15(5), pp. 1060-1069.
- Subramaniam, B., Rajewski, R.A. y Snavely, K. (1997): "Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, pp. 885–890.
- Suleyman H., Albayrak A., Bilici M., Cadirci E. y Halici Z. (2010): "Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers", *Inflammation*, 33(4), pp. 224-234.
- Sun, Y., Zhu, L., Wu, T., Cai, T., Gunn, E.M. y Yu, L. (2012): "Stability of amorphous pharmaceutical solids: crystal growth mechanisms and effect of polymer additives", *The AAPS Journal*, 14(3), pp. 380-388.
- Sweetman, S. C. (Ed.). (2011): *Martindale: The Complete Drug Reference*, Londres, Pharmaceutical Press.
- Takeuchi, H., Nagira, S., Tanimura, S., Yamamoto, H. y Kawashima, Y. (2020): "Tabletting of solid dispersion particles consisting of

- indomethacin and porous silica particles”, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 53(5), pp. 487-491.
- Tantishaiyakul, V. y Kaewnopparat, N. (1999): “Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone K-30”, International Journal of Pharmaceutics, 181(2), pp. 143-51.
 - Taylor, L. S. y Zografi, G. (1997): “Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions”, Pharmaceutical Research, 14(12), pp. 1691-1698.
 - Tho, I., Liepold, B., Rosenberg, J., Maegerlein, M., Brandl, M. y Fricker, G. (2010): “Formation of nano/micro-dispersions with improved dissolution properties upon dispersion of ritonavir melt extrudate in aqueous media”, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 40, pp. 25–32.
 - Timko, R.J. y Lordi, N.G. (1979): “Thermal characterization of citric acid solid dispersions with benzoic acid and phenobarbital”, Journal of Pharmaceutical Sciences, 68, pp. 601–605.
 - Torrado, S., Torrado, J.J. y Cadórniga, R. (1992): “International Journal of Pharmaceutics, Topical application of albumin microspheres containing vitamin A”, *Drug release and availability*, 86, pp. 147-152.
 - Universidad Complutense de Madrid (1994): *Estudio farmacéutico de nuevas formulaciones galénicas de albendazol*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia. Disponible en: <http://webs.ucm.es/BUCM/tesis//19911996/D/1/AD1012901.pdf>. [Consulta: 21 de marzo de 2019]
 - Universidad de Málaga (2006): *Difracción de Rayos X*. Disponible en: <http://www.xdataser.com/index.php/difraccion-de-rayos-x/>. [Consulta: 20 de marzo de 2019]
 - FDA. Draft Guidance: Guidance for Industry: topical dermatological drug product NDAs and ANDAs- in vivo bioavailability, bioequivalence, in vitro release, and associated studies. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER); 1998.
 - USP 42 (United States Pharmacopoeia 42). 2019.

- Uwai, Y., Saito, H. y Ichilnui, K. (2000): "Interaction between methotrexate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in organic anion transporter", *European Journal of Pharmacology*, 409(1), pp.31-36.
- Vaile, J.H. y Davis, P. (1998): "Topical NSAIDs for musculoskeletal conditions", *Drugs*, 56, pp. 783–799.
- Van den Mooter G., Weuts I., De Ridder T. y Bleton N., (2006): "Evaluation of Inutec SP1 as a new carrier in the formulation of solid dispersions for poorly soluble drugs", *International Journal of Pharmaceutics*, 316, pp. 1–6.
- van Drooge, D.J., Hinrichs, W.L., Visser, M.R. y Frijlink, H.W. (2006): "Characterization of the molecular distribution of drugs in glassy solid dispersions at the nano-meter scale, using differential scanning calorimetry and gravimetric water vapour sorption techniques", *International Journal of Pharmaceutics*, 310, pp. 220–229.
- Vane J. R. (1971): "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs", *Nature New Biology*, 231, pp. 232-235.
- Vasconcelos, T., Sarmiento, B. y Costa, P. (2007): "Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs", *Drug Discovery Today*, 12, pp. 1068-1075.
- Verreck, G., Chun, I., Rosenblatt, J., Peeters, J., Van Dijck, A., Mensch, J., Noppe, M., y Brewster, M. E. (2003): "Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-Insoluble, nonbiodegradable polymer", *Journal of Controlled Release*, 92(3), pp. 349-60.
- Villarino N., Landoni.M. (2006): "Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica", *Analecta Veterinaria*, 26 (1), pp. 28-37.
- Wang, X., Michel, A. y Van den Mooter, G. (2005): "Solid state characteristics of ternary solid dispersions composed of PVP VA64, Myrj 52 and itraconazole", *International Journal of Pharmaceutics*, 303, (1-2), pp. 54-61.
- Wollina, U. (2014): "Recent advances in the understanding and management of rosácea", *F1000 Prime Reports*, 6, p. 50.

- Won, D.-H., Kim M.S., Lee S., Park J.S. y Hwang S.J. (2005): "Improved physicochemical characteristics of felodipine solid dispersion particles by supercritical anti-solvent precipitation process", *International Journal of Pharmaceutics*, 301, pp. 199–208.
- World Health Organization, (2006), Who Press.
- Yacobi, A., Shah, V.P., Bashaw, E.D., Benfeldt, E., Davit, B., Ganes, D., Ghosh, T., Kanfer, I., Kasting, G.B., Katz, L., Lionberger, R., Lu, G.W., Maibach, H.I., Pershing, L.K., Rackley, R.J., Raw, A., Shukla, C.G., Thakker, K., Wagner, N., Zovko, E. y Lane, M.E., (2014): "Current challenges in bioequivalence, quality, and novel assessment technologies for topical products", *Pharmaceutical Research*, 31, pp. 837–846.
- Yamashita, K., Nakate, T., Okimoto, K., Ohike, A., Tokunaga, Y., Ibuki, R., Higaki, K., Kimura, T. (2003): "Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus" *Int J Pharm*, 267(1-2), pp. 79-91.
- Yao, W.W., Bai, T.C., Sun J.P. y Cheng-Wen, Z. (2005): "Thermodynamic properties for the system of silybin and poly(ethylene glycol) 6000", *Thermochimica Acta*, 437, pp. 17–20.
- Zallen, R. (2008): *The Physics of Amorphous Solids*, Nueva York, John Wiley and Sons.